

Versuche zum Nachweis
eines second messengers des Insulins

Ulrich Michalski

Diss.
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0069

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des
Städtischen Krankenhauses München-Schwabing
Direktor (Vorstand): Prof. Dr. med. O. Wieland
und der Forschergruppe Diabetes
Gemeinsame Leitung: Prof. Dr. med. O. Wieland
Prof. Dr. med. H. Mehnert

Versuche zum Nachweis eines
second messengers des Insulins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Michalski

aus

Rosenfeld

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. O. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.1984

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND METHODEN	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Chemikalien	11
2.1.2 Geräte	12
2.1.3 Tiere	13
2.2 Methoden	13
2.2.1 Reinigung der AATase aus Taubenleber	13
2.2.2 PDH-Phosphatase-Präparation aus Schweineherzen	15
2.2.3 Versuche mit menschlicher Plazenta	16
2.2.4 Versuche mit Rattenhoden	17
2.2.4.1 Messung der U- ¹⁴ C-Glukoseoxidation	18
2.2.5 Herstellung von Rattenfettgewebszellen	18
2.2.6 Mitochondrienpräparation aus Fettzellen	19
2.2.7 Herstellung von Fettzell-Homogenaten und Mitochondrienextrakten zur PDH-Bestimmung	20
2.2.8 Bestimmung von aktiver Form (PDH _a) und PDH-Gesamtaktivität	21
2.2.9 Bestimmung der Adeninnukleotide AMP und ADP	22
3. ERGEBNISSE	24
3.1 Versuche zur Herstellung isolierter Plazentazellen	24
3.1.1 U- ¹⁴ C-Glukoseoxidation durch Plazentagewebe	24
3.1.2 PDH-Aktivität der Plazenta	25
3.1.3 Diskussion	27

	Seite	
3.2	Hodengewebe, U- ¹⁴ C-Glukoseoxidation	28
3.2.1	PDH-Aktivität von Rattenhodengewebe	29
3.2.2	Diskussion	29
3.3	Versuche mit isolierten Fettzellen	30
3.3.1	Effekt von Insulin auf die PDH-Aktivität intakter Fettzellen	30
3.3.2	Wirkung von Fettzellextrakten auf die PDH-Aktivität isolierter Fettzell-mitochondrien	31
3.3.3	Säulenchromatographie der Zellextrakte an Sephadex G-25 fine	33
3.3.4	AMP und ADP als mögliche Aktivatoren	40
3.3.4.1	Versuche mit AMP- und ADP-Standard-lösungen	40
3.3.4.2	Effekt der Behandlung der Extrakte mit Tierkohle	42
3.3.5	Untersuchung verschiedener Zellauf-schlußverfahren	42
3.4	Diskussion	45
4.	Zusammenfassung	51
5.	Literatur	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AATase	Arylamin-Acetyltransferase
ADP	Adenosindiphosphat
Alu Gel	Aluminiumhydroxid Gel
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine Fraction V
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz
EGTA	Äthylen-glycol-bis(2-amino-äthyläther)N, N'-tetraessigsäure
Glu-6-P-Dh	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Hb	Hämoglobin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
MET	Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht in Dalton
MK	Myokinase
P _a	anorganisches Phosphat
p.a.	per analysem
PDH	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
pNA	p-Nitroanilin
PTA	Phosphotransacetylase
RIA	Radioimmunoassay
TCA	Trichloressigsäure
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRAM	Triäthanolamin
Tris	Tri(hydroxymethylaminomethan) p.a.

1. EINLEITUNG

Seit rund 60 Jahren ist das Hormon Insulin bekannt. Durch Sanger erfolgte 1959 die Strukturaufklärung (65). Obwohl viele Wirkungen des Insulins auf den Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel in verschiedenen Zielgeweben wie Leber, Muskel und Fett festgestellt wurden, ist der zugrundeliegende Mechanismus noch immer unklar. Dies gilt auch für die Aktivierung des PDH-Komplexes im Fettgewebe, ein Effekt des Insulins, der seit seiner Entdeckung vor mehr als 10 Jahren (34) in diesem und anderen Laboratorien eingehend untersucht wurde (Übersicht bei (59), (89)). Zur Einführung sollen im folgenden die wesentlichen Eigenschaften dieses Multienzym-Komplexes beschrieben werden.

Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex gehört zu den interkonvertierbaren Enzymsystemen, deren Aktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird. Er ist im Membran-Matrix-Raum der Mitochondrien lokalisiert (1), (52), (67).

Das Molekulargewicht des Enzyms aus Rindernieren beträgt 7 000 000, das aus Rinderherzen 8 500 000. Die Lipoacyltransferase (E_2) bildet den Kern des Komplexes, an den die weiteren Teile durch nichtkovalente Bindung angelagert sind (29), (43). Das Kernenzym ist aus 60 identischen Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von 52 000 zusammengesetzt, woraus sich ein Gesamtmolekulargewicht von 3 100 000 ergibt (2). An jedes der Monomere ist ein Lipoyl-Rest kovalent gebunden (87). Die Dihydrolipoyldehydrogenase (E_3) besteht aus zwei identischen Untereinheiten zu je 55 000 Dalton; jede enthält ein Molekül FAD. Die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität (E_1) besteht aus zwei nichtidentischen Polypeptiden, die zusammen ein Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit dem Molekulargewicht 154 000 bilden (2). Ferner

besitzt der Komplex Kinase und Phosphatase als regulierende Untereinheiten. Die Kinase ist bei der Reinigung eng an die Transacetylase (E_2) gebunden, während die Phosphatase leicht abzutrennen ist. Drei bis fünf Moleküle der Kinase und Phosphatase sind pro Molekül PDH vorhanden, und zwar als Dimere. Dies scheint in bezug auf die Regulation von Bedeutung zu sein (89). Eine Übersicht über die Zusammensetzung des Herzmuskelenzyms gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung des PDH-Komplexes aus Rinderherz (nach (89))

Enzym	MG	Untereinh.		Untereinh. pro Komplex
		Anz.	MG	
Gesamtkomplex	8 500 000			
Pyruvatdehydrogenase (E_1)		2	41 000	60
		2	36 000	
Dihydrolipoyltransacetylase (E_2)	3 100 000	60	52 000	60
Dihydrolipoyldehydrogenase (E_3)	110 000	2	55 000	12
Kinase	~100 000	1	48 000	
		1	45 000	
Phosphatase	~150 000	1	97 000	
		1	50 000	

Die Funktion des PDH-Komplexes besteht in der oxidativen Dekarboxylierung von Pyruvat, gemäß folgender Gleichung:



Diese Reaktion nimmt eine Schlüsselposition im Zellstoffwechsel ein, da sie

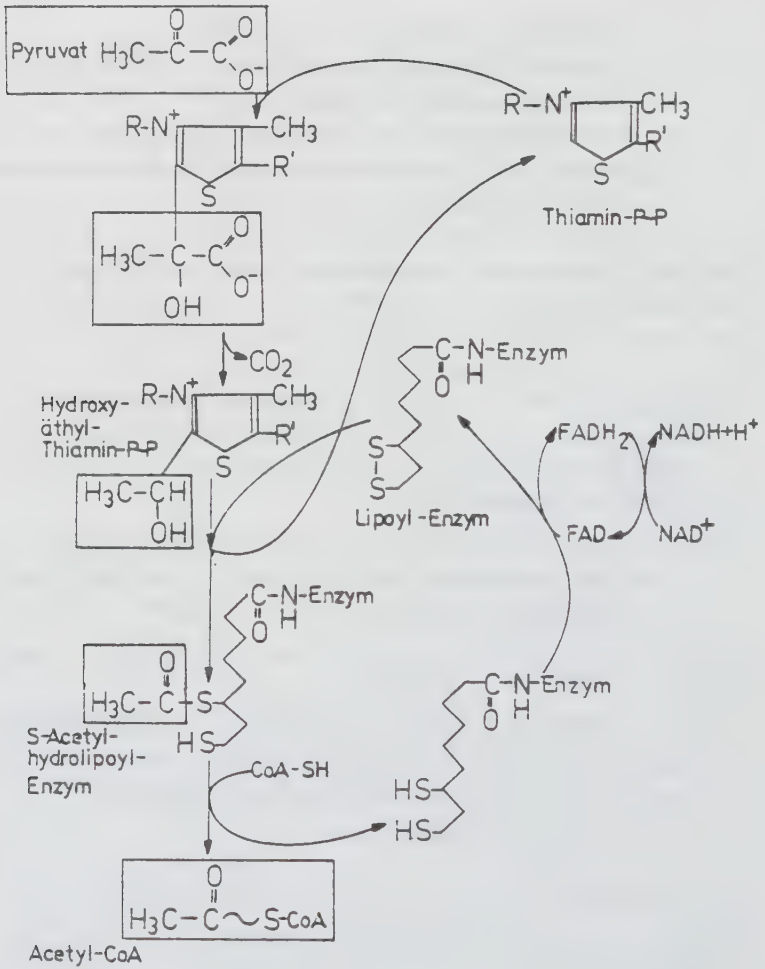
- i) praktisch irreversibel verläuft,
- ii) aus dem Kohlenhydrat- und Proteinabbau C_2 -Fragmente liefert, die
- iii) entweder in den Citratzyklus zur Energiegewinnung durch Oxidation oder zur Synthese von Fettsäuren dienen können.

Die mit Gleichung (a) bezeichnete Reaktion zerfällt in drei Hauptschritte, entsprechend den drei enzymatisch aktiven Untereinheiten des Komplexes:

- Im ersten Schritt wird mit Hilfe der Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) Pyruvat durch Dekarboxylierung unter Anlagerung an Thiaminpyrophosphat zum "aktiven Acetaldehyd" umgewandelt.
- Die Lipoatacetyltransferase (EC 2.3.1.12) lagert dann diesen unter Dehydrierung an einen α -Liponsäurerest an, wobei Acetyldihydrolipoat entsteht.
- Durch Transacetylierung auf Coenzym A entsteht Acetyl-CoA.

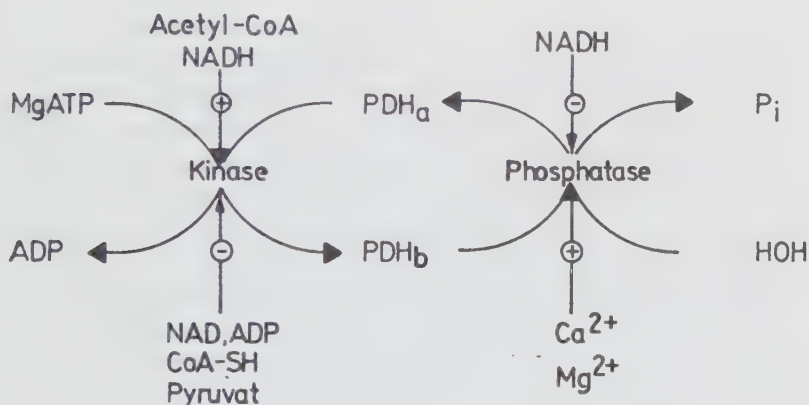
Das reduzierte Lipoat wird schließlich durch Dihydrolipoyldehydrogenase (EC 1.6.4.3), ein FAD-haltiges Enzym, reoxidiert. Die gesamte Reaktionsfolge ist in Figur 1 dargestellt.

Der PDH-Komplex unterliegt einer zweifachen Regulation, einmal durch Endprodukthemmung und zum anderen durch Phosphorylierung-Dephosphorylierung. Endprodukthemmung wurde für Acetyl-CoA und NADH nachgewiesen (7), (21), (90), wobei diese kompetitiv mit CoA-SH und NAD^+ ist. Denton (18) vermutet, daß hohe Quotienten Acetyl-CoA/CoA-SH und $NADH/NAD^+$ den Anteil der Lipoyl-Gruppen in der oxidierten Form an der Lipoatacetyltransferase herabsetzen. Rückwirkend wird weniger Thiaminpyrophosphat



Figur 1: Reaktionsablauf bei der oxidativen Dekarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA (nach (24))

gebildet: Die Pyruvatdecarboxylase wird verringert. Der zweite Regulationsmechanismus durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung führt zu Inaktivierung bzw. Reaktivierung des Enzyms (Figur 2).



Figur 2: Regulation der PDH durch Phosphatase und Kinase.
 - Hemmung; + Stimulierung; PDH_a: Dephosphorylierte Form, PDH_b: Phosphorylierte Form;
 P_i: anorganisches Phosphat
 (entnommen aus (89))

Damit gehört der PDH-Komplex zu den interkonvertierbaren Enzymsystemen, deren Aktivitätszustand von den relativen Aktivitäten phosphorylierender und dephosphorylierender Enzyme abhängt. Dieses Prinzip der Enzymregulation ist in höheren Organismen weit verbreitet.

Die Phosphorylierung der PDH wurde zuerst an Rindernieren (45), Rinderherzen und Schweinelebern (44) und

Schweineherzen (90) gezeigt. Die erste Beschreibung am Fettgewebe erfolgte durch Jungas (35). Später stellte sich heraus, daß bis zu 3 Phosphatreste in das Enzym eingebaut werden können, wobei jedoch für die Regulation die Besetzung nur einer Stelle ausschlaggebend ist (89).

Das für die Phosphorylierung und damit Inaktivierung zuständige Enzym, die Kinase, ist eng an die Lipoat-acetyltransferase gebunden (43), (44). Es sind nur drei bis fünf Kinasemoleküle, die die viel zahlreicheren Serylreste der α -Ketten der Pyruvatdehydrogenaseuntereinheiten nach einem Mechanismus phosphorylieren, der noch weitgehend ungeklärt ist. Substrat der PDH-Kinase ist MgATP (27). ADP und Pyruvat dagegen schützen vor der Inaktivierung durch ATP (44). ADP wirkt dabei kompetitiv zu ATP, Pyruvat offenbar direkt auf die PDH und jedenfalls nicht auf die Kinase. Gehemmt wird die Kinase durch Dichloracetat und durch organische Säuren wie Acetat, Butyrat und Propionat (18). Kompetitiv zu Mg^{2+} wirken die Ionen Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} und Mn^{2+} (96).

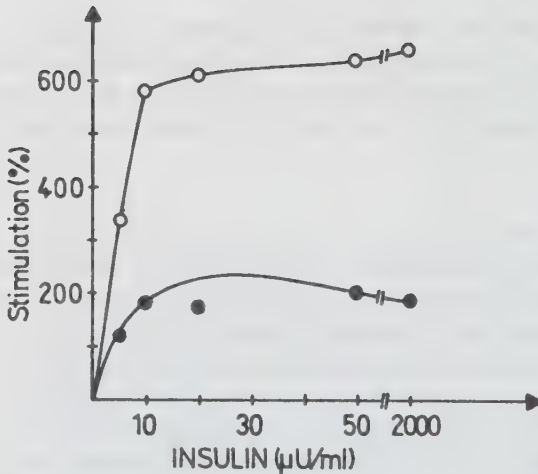
Die Phosphatase ist nur locker an den Enzymkomplex gebunden. Aus Schweineherzen wurde sie bis auf das 8 500-fache angereichert (75) und dabei ein Molekulargewicht von ungefähr 100 000 ermittelt. Mg^{2+} , das durch Mn^{2+} ersetzt werden kann, ist für die Reaktion notwendig. Unentbehrlich ist auch Ca^{2+} in mikromolarer Konzentration (11), (75). Dabei hilft Ca^{2+} wahrscheinlich bei der Bindung an die Transacetylase und erleichtert so die Mg^{2+} -abhängige Dephosphorylierung der phosphorylierten PDH (57). Aus Figur 2 ergibt sich die Rolle der mitochondrialen Quotienten ATP/ADP, NADH/NAD und Acetyl-CoA/CoA-SH. Der kompetitive Mechanismus der ATP/ADP-Wirkung ist geklärt, nicht dagegen derjenige der anderen Effektoren (89).

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich bei der Phosphatase um ein dimeres Protein handelt mit 2 nichtidentischen Untereinheiten. Die kleinere dieser Untereinheiten war offenbar während der früheren Reinigung der Phosphatase abgetrennt und deshalb übersehen worden (61).

In-vivo-Regulation

Daß die am isolierten Enzym in vitro entdeckte Interkonvertierung des PDH-Komplexes auch in vivo stattfindet, wurde durch Wieland und Siess (Schweineherz (93)), Wieland (Rattenherz und -nieren (95)), Denton (Rattenfettgewebe (16)), Weiss (Rattenfettgewebe (85)), Jungas (Rattenfettgewebe (35)) und Söling (Rattenleber (76)) nachgewiesen. Besonders interessant war die Beobachtung, daß der PDH-Komplex des Fettgewebes durch Insulin aktiviert wird (16), (35), (85). Damit bot sich ein leicht zugängliches Modell, um den Mechanismus einer schnellen Steuerung eines Enzyms durch Insulin zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß die Aktivierung darauf beruht, daß das Enzym nach Hormongabe von der inaktiven, phosphorylierten Form (PDH_b) in die aktive, dephosphorylierte Form (PDH_a) übergeführt wird (12), (16), (85). Da die Umwandlung von Glukose in Fettsäuren auf der Stufe der PDH-Reaktion kontrolliert wird, ist die bekannte stimulierende Wirkung des Insulins auf diesen Prozeß nunmehr geklärt (35), (98), (99).

Voraussetzung für den Effekt des Insulins auf die PDH ist das Vorhandensein von Glukose oder eines anderen verwertbaren Zuckers als Substrat (81), (82), (86), (96), (97).



Figur 3: Wirkung von Insulin auf die Glukoseoxidation und PDH-Aktivität in isolierten Rattennebenhodenfettzellen.
o-o $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion; •-• PDH_a, gemessen als Prozentsatz der Gesamt-PDH (entnommen aus (89))

Wirkungsmechanismus

Die Frage, wie das Signal des Insulins vom Rezeptor in die Mitochondrien, den Ort der PDH, geleitet wird, ist noch nicht geklärt. Zahlreiche Forschungsarbeiten zu diesem Problem liegen vor. Dabei wurden vor allem die mögliche Rolle von Nukleotiden, Ionen, Phospholipiden, Sulfhydryl-Gruppen und Wasserstoffperoxid als Mediatoren (second messenger) untersucht (Übersichten in (13), (15), (89)).

Second messenger Prinzip (77), (88)

Allgemein ausgedrückt sieht dieses Prinzip wie folgt aus:
Durch Anlagerung eines Hormons (first messenger) an die

Zellmembran (Rezeptor) wird ein Enzym aktiviert, das den second messenger freisetzt. Dieser wiederum vermittelt die Wirkungen des Hormons auf den Zellstoffwechsel. Der second messenger muß dann wieder inaktiviert werden, damit das ganze System kontrollierbar bleibt.

Der klassische Fall ist das von Sutherland (78), (88) entdeckte cyclische AMP, das den second messenger der β -adrenergen Hormone darstellt. Cyclo-AMP wird durch das Enzym Adenylatcyclase als Antwort auf die Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung vermehrt gebildet und löst seinerseits durch Aktivierung verschiedener Proteinkinasen mannigfache Stoffwechseleffekte aus. Ein typisches Beispiel ist die Glykogenmobilisierung durch Katecholamine und Glukagon.

Wieland (89), Denton (15) und Czech (13) kommen in ihren Übersichtsarbeiten zu dem Schluß, daß cAMP die Rolle des second messengers bei der Aktivierung des PDH-Komplexes durch Insulin nicht spielen kann. Wirkungen von cAMP auf Kinase und Phosphatase konnten bei PDH-Präparationen verschiedener Reinheitsgrade nicht nachgewiesen werden (18), (35), (60), (73). Dibutyryl-cAMP, inkubiert mit Fettgewebe normal gefütterter Tiere, hob die Stimulierung der PDH durch Insulin auf (12). Bei Abwesenheit anderer Hormone konnten nur geringe Effekte von Insulin auf den cAMP-Spiegel im Fettgewebe gefunden werden (15). Nicht so eindeutig sind die Ergebnisse allerdings bei Einwirkung mehrerer Hormone gleichzeitig.

Ausgehend von den Arbeiten Larners und seiner Mitarbeiter (42) erschienen in letzter Zeit mehrere Berichte, wonach ein Peptid die Rolle eines second messengers des Insulins spielen soll. Dieses Peptid soll durch Aktivierung einer Protease aus einem Protein der Plasmamembran freigesetzt

werden und sowohl die Glykogensynthese im Muskel, als auch die PDH im Fettgewebe aktivieren (32), (38), (55), (58), (63), (64), (68), (69), (70). Aus all diesen Arbeiten ergeben sich folgende Eigenschaften für die Substanz:

- Sie ist hitze- und säurestabil,
- hat ein Molekulargewicht von ca. 1 000 - 2 000
- entsteht insulinabhängig
- und stimuliert die PDH über einen NaF-empfindlichen Mechanismus.

Inhalt der Arbeit

Das bisher in der Literatur vorliegende Material läßt allerdings noch Zweifel an der Bedeutung dieses Peptid-Mediators zu. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zur weiteren Klärung dieses Problems beizutragen.

Im Prinzip sollte dabei folgendermaßen vorgegangen werden: Insulinempfindliche Gewebe wurden in vitro in Anwesenheit des Hormons inkubiert und aufgeschlossen. Die Extrakte wurden sodann zu isolierten Fettzellmitochondrien zugesetzt und die PDH-Aktivität gemessen. Das Vorhandensein eines secondmessengers in den Gewebeextrakten sollte sich in einer Aktivierung des PDH-Komplexes feststellen lassen. Für diese Untersuchungen schien Fettgewebe wegen seines hohen Fettbalastes nicht unbedingt am geeignetsten. Es wurde deshalb in Vorversuchen nach anderen Geweben mit Ansprechbarkeit auf Insulin gefahndet, die eventuell günstigere experimentelle Voraussetzungen bieten würden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Apotheke des Städt. Krankenhauses München-Schwabing	TCA Biuret-Reagenz
Balston Ltd., England	DE-52-Whatman-Zellulose
Boehringer, Mannheim	alle organischen Materialien, soweit nicht anders vermerkt
Calbiochem Behring Corp., La Jolla, USA	BSA (je 200 g wurden unter vorsichtigem Rühren in 1 l Wasser gelöst, bei 4°C 24 h gegen Wasser dialysiert)
Fluka AG, Buchs, Schweiz	β -Phenyläthylamin
ICI, Frankfurt	Lubrol PX
Merck, Darmstadt	alle anorganischen Chemikalien Dioxan MET p-NA Dinonylphthalat Tris p.a. EDTA/Titriplex III
Merz + Dade AHS-Deutschland GmbH, München	Lab-trol E
Nordmark Werke GmbH, Hamburg	Heparin als "Thrombophob" ad inj., Hep.-Na ⁺ , pro ml 5 000 USP.-E, 5 mg Chlorocresol Konservierungsmittel
Novo Industrie Pharmaceutica, Mainz	Insulin Actrapid MC aus Schweinepankreas
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden	Sephadex G-25 fine

The Radiochemical Centre Amersham, England	D-(U- ¹⁴ C)-Glukose 260 mCi/ mmol
Roth KG, Karlsruhe	Szinti-Gel
Sartorius, Göttingen	Kollodium-Hülsen (SM 13 200, Ausschlußgrenze MG 12 000)
sero-med GmbH, München	Kollagenase Typ Worthington CLS
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	HEPES p.a. EGTA PTA Alu Gel S Dialyseschläuche Visking Type 20/32 Aktivkohle Norit A
Wacker Chemie, München	Silikonöl AK 20
Dr. E.A. Siess	stellte freundlicherweise Calcium-Phosphat-Gel zur Verfügung

2.1.2 Geräte

American Inst. Cop., USA	Aminco-Bowman Spectrophoto- fluorometer
B. Braun, Melsungen	Ultraschall Labsonic 1510 Mikrodismembrator
DuPont, USA	Sorvall RC 5B Zentrifuge
Eppendorf, Hamburg	Photometer mit Kompensa- tionsschreiber Tischzentrifuge 3200 Mikrocups Mikropipetten
Braun AG, Frankfurt	Starmix
Gesellschaft für elektro- physikalischen Gerätebau, Brandau	Präparationszentrifuge Wkf G 50 K Lyophilisator Wkf L 05 S

Inst. Lab. Inc., Oberlin, USA	Gilford Spectrophotometer 250
Hettich, Tuttlingen	Rotixa Zentrifuge
Junke + Kunkel KG, IKA- Werke, Staufeu, Breisgau	Ultra-Turrax nach Prof. Willems
Inst. Comp. Inc. Warrenville, Ill., USA	Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer
Potter-Elvehjem	Glas-Teflon Homogenisierer

2.1.3 Tiere

Ca. 200 g schwere, männliche Sprague-Dawley-Ratten, gehalten in modernen Laborställen und gefüttert mit Standardfutter Ssniff, Versuchstier-Diäten GmbH, Soest/Westfalen.

2.2 Methoden

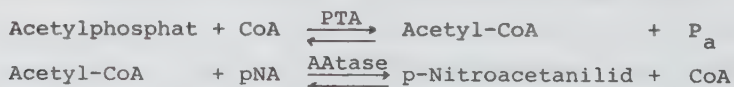
2.2.1 Reinigung der AATase aus Taubenleber (modifiziert nach (80))

Die gesamte Präparation erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, bei 4° C. Bei -20° C gelagerte Taubenlebern wurden mit der doppelten Gewichtsmenge Puffer (1 mM EDTA, 10 mM MET) im Starmix homogenisiert. Dabei wurde das Gerät zunächst auf Stufe 1 geschaltet, anschließend die breiartige Flüssigkeit noch 3 min. lang auf Stufe 3 behandelt. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16 000 g in der Präparationszentrifuge. Das Sediment wurde mit dem gleichen Volumen des Puffers 3 mal 1 min. im Starmix auf Stufe 1 homogenisiert und zentrifugiert. Den Überständen wurde Azeton bis zur Endkonzen-

tration von 40 % zugegeben und dabei die Temperatur auf -10°C abgesenkt. Nach einer weiteren Zentrifugation wie oben wurde zum Überstand wieder Azeton bis 70 % Sättigung zugesetzt und die Temperatur währenddessen auf -20°C abgesenkt. Nach Zentrifugieren wurden die Niederschläge in 1 mM KPO_4 -Puffer, pH 7,0, gelöst.

Die weitere Enzymanreicherung erfolgte mit Alu-Gel. 90 % der vorhandenen Aktivität sollten an das Gel gebunden werden. Um die dafür notwendige Menge zu ermitteln, wurde zu einer Verdünnungsreihe der Enzympräparation eine konstante Menge Gel gegeben, abzentrifugiert und die im Überstand verbliebene Enzymaktivität im unten angegebenen Testansatz gemessen. Das Enzym wurde so lange mit Puffer (5 mM KPO_4 , pH 7,0; 5 mM MET; 1 mM EDTA) vom Gel gewaschen, bis die gesammelten Überstände 80 % der ursprünglich am Gel adsorbierten Aktivität aufwiesen. Diese wurden mit Ammoniumsulfat (0,56 g/ml) gefällt und zentrifugiert, die Rückstände in Puffer (10 mM KPO_4 , pH 7,0; MET 5 mM; 1 mM EDTA) aufgenommen, 12 Stunden gegen den selben Puffer dialysiert, bei 20 000 g zentrifugiert und die Überstände verwandt.

Die Enzymaktivität wurde nach folgendem Prinzip gemessen:



Die Acetylierung von pNA durch die AAtase geht mit einer Entfärbung einher, die photometrisch bei 405 nm und 25°C verfolgt wurde. Acetyl-CoA wurde im Test durch Phosphotransacetylase aus Acetylphosphat regeneriert.

Der Testansatz enthielt 500 μl Testgemisch (aus 2 ml KPO_4 -Puffer 250 mM, pH 8,0; 0,2 ml CoA 10 mM; 3 ml pNA 1 mM;

1 ml MET 1 M; 0,02 ml PTA 1 mg/ml; 1 ml Acetylphosphat 250 mM; 2,78 ml H₂O) und 490 µl H₂O. Der Start der Reaktion erfolgte mit 10 µl Suspension der Enzympräparation.

2.2.2 PDH-Phosphatase-Präparation aus Schweineherzen (75), (93)

Die gesamte Präparation erfolgte bei 0° - 4° C.

Bei -24° C gelagertes Gewebe wurde mit der dreifachen Gewichtsmenge Puffer A (20 mM KPO₄; 2 mM MET; 1 mM MgCl₂) im Starmix 5 min. lang ohne Unterbrechung homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min. bei 10 000 g zentrifugiert. Die Niederschläge wurden erneut mit 500 ml Puffer A/500 g Niederschlag homogenisiert, anschließend 10 min. bei 10 000 g zentrifugiert. Zu den Überständen wurde bis zur Endkonzentration von 1,6 M Ammoniumsulfat gegeben, 15 min. bei 10 000 g zentrifugiert, das Präzipitat wurde mit Puffer A aufgenommen und 14 Stunden gegen das 50-fache Volumen von Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde 30 min. bei 10 000 g zentrifugiert. 600 ml einer Calciumphosphat-Gel-Suspension (28 mg Trockengewicht pro ml H₂O) wurden zugesetzt, 5 min. bei 10 000 g zentrifugiert und das Gel gesammelt. Um das Enzym vom Gel zu eluieren, erfolgte eine weitere Ammoniumsulfatfällung: Festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,5 M wurde zu den Geleluaten gegeben, anschließend 15 min. bei 10 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Puffer A aufgenommen und gegen das 100-fache Volumen an Puffer A dialysiert. Zu dem Dialysat aus diesem Schritt wurden 28 g feuchte DE-52-Zellulose zugesetzt. Diese war zuvor mit Puffer A gewaschen worden. Sie wurde verwendet, nachdem pH und Molarität des Wasch-

puffers konstant blieben. 2 min. lang wurde bei 10 000 g zentrifugiert und die Zellulose zweimal mit dem dem Dialysat gleichen Volumen Puffer A (66,5 ml) gewaschen. Die Phosphatase wurde durch 6 weitere Waschungen mit 0,3 M KCl in Puffer A (jede mit 2/3 des DE-52-Gewichts) eluiert. Die erste Waschung wurde verworfen, die folgenden fünf gepoolt, 6 Stunden gegen das 50-fache Volumen 20 mM KPO_4 -Puffer pH 7,0 dialysiert (Puffer wurde nach zwei Stunden gewechselt) und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde im kleinstmöglichen Volumen des Puffers A gelöst und 5 min. bei 27 000 g zentrifugiert. Die Phosphatase befand sich im Überstand.

Die Enzymaktivität wurde nach folgendem Prinzip gemessen:

Freundlicherweise von Herrn Dr. F. Machicao zur Verfügung gestellte phosphorylierte PDH (50 mU) wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit 0,2 μmol MgCl_2 und 5 μl Phosphatasepräparation in einem Eppendorf-Cup 5 min. bei 25° C inkubiert. Dabei wurde die Phospho-PDH in die aktive De-phospho-PDH überführt. Von 10 μl wurden nach dem in 2.2.8 beschriebenen AATase-Test die PDH-Aktivität bestimmt.

2.2.3 Versuche mit menschlicher Plazenta

Die Plazenten wurden unmittelbar post partum (nach Berücksichtigung durch den Gynäkologen) in Eis zum Laborplatz gebracht. Dann wurden 50 ml eines eiskalten Krebs-Henseleit-Puffers (121 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 1,2 mM MgSO_4 ; 25 mM NaHCO_3) mit 1 ml Heparin durch ein Nabelschnurgefäß injiziert, um die Blutgerinnung zu hemmen. Mit bis zu 4 l Krebs-Henseleit-Puffer wurden die Gefäße durchgespült. Anschließend wurden von den Berei-

chen, die makroskopisch am blutleersten erschienen, kleine Gewebstückchen in die Inkubationsansätze eingewogen.

Aus dem Gewebe wurde entsprechend dem Verfahren mit den Fettzellen die Gesamt-PDH nach Phosphatase-Aktivierung bestimmt (2.2.8).

Um das Bluteiweiß im Plazentagewebe zu berücksichtigen, wurde über eine Hb-Bestimmung auf das Bluteiweiß umgerechnet (modifiziert nach (72)). Mit hypotoner NaCl (0,12 %) wurde das Blut aus einer Gewebprobe hämolysiert, die festen Bestandteile durch 5 min. Zentrifugation bei 670 g sedimentiert, der noch trübe Überstand filtriert (Schleicher & Schüll, 595 1/2, Ø 150 mm, Ref.No. 304 205) gefällt und anschließend 5 min. bei 43 000 g zentrifugiert. Im folgenden wurde entsprechend der Labor-Routine-Methode (6) zur Hb-Bestimmung verfahren. Bei der Berechnung wurde von einem Wert von 140 mg/dl Hämoglobin und einem Gesamteiweiß von 70 mg/ml Plasma ausgegangen. Der nach der Biuret-Methode bestimmte Eiweiß-Wert wurde um das Blutprotein korrigiert.

2.2.4 Versuche mit Rattenhoden

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, die Hoden entfernt, die Kapsel mit der Rasierklinge gespalten. Die hervorquellenden Hodenkanälchen wurden zur Bestimmung der spezifischen PDH-Aktivität (2.2.8) mit der Gefrierstoppmethode weiterbehandelt, d.h. sofort in flüssigen N₂ gegeben und wie unter 2.2.5 aufgeschlossen und gemessen.

Für die Inkubationsversuche mit Insulin wurde das Gewebe wie folgt behandelt: Die Hodenkanälchen wurden durch

ein handelsübliches Teesieb gedrückt, um eine möglichst homogene Suspension mit möglichst geringer Schädigung der Zellen zu erlangen (Methode modifiziert nach (23)), und im vierfachen Gewicht eiskalten Krebs-Henseleit-Puffers aufgenommen, zweimal für 5 sec. bei 50 g in der Hettich Zentrifuge Modell Rotixa zentrifugiert und jeweils im selben Volumen aufgenommen.

2.2.4.1 Messung der U-¹⁴C-Glukoseoxidation (74)

In einem Gesamtansatz von 2,2 ml (Plazenta, Hoden) wurden zugegeben: kalte Glukose 3,7 mM, Insulin in der entsprechenden Konzentration (in der Kontrolle 0,03 N HCl), 0,1 μ Ci/ml U-¹⁴C-Glukose. Die Proben wurden nach Zugabe von Gewebe und Reagentien mit einer Gummikappe verschlossen, bei 37° C im Schüttelbad mit 50 Anschlägen/min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500 μ l 8 N H₂SO₄, injiziert mit einer Spritze durch den Gummi, abgestoppt. Die Probe blieb 10 min. im Salz-Eisbad stehen. Schließlich wurden in ein im Reagenzglas aufgehängtes Töpfchen 250 μ l β -Phenyläthylamin injiziert. Nach 1 Stunde bei Zimmertemperatur wurde der Gummipfropf abgenommen, das Töpfchen in ein Packard-Gefäß mit 10 ml Szinti-Gel gegeben, verschlossen und in den Packard-Zähler eingeordnet.

2.2.5 Herstellung von Rattenfettgewebszellen (62)

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, dann das Nebenhoden-Fettgewebe sowie das Fettgewebe aus den Nie-

renlagern entfernt und in die Inkubationsgefäße zur Kollagenaseverdauung gegeben, die auf 37° C vorgewärmt waren. Das Medium bestand aus 10 ml 2,5 % BSA HEPES (2,5 % Albumin in: 121 mM NaCl; 5 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 25 mM HEPES; pH 7,4 bei 37° C), 18 mg Kollagenase, 10 µl 555 mM Glukose für 5 g Fettgewebe. Darin wurden die Fettpads mit der Schere zerkleinert, nach Carbogenbegasung (95 % O₂, 5 % CO₂) das Gefäß luftdicht verschlossen und 40 min. bei 37° C im Schüttelbad mit 120 Anschlägen/min. inkubiert. Anschließend wurde die Inkubationsflüssigkeit durch eine doppelte Lage Verbandsgaze in ein Reagenzglas abgeschüttet und mit 1,25 % BSA HEPES, 37° C, pH 7,4, aufgefüllt. Die Zentrifuge wurde auf 27 g (Hettich Zentrifuge Modell Rotixa) aufgedreht, sofort wieder abgedreht und der Unterstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieses Waschen wurde dreimal wiederholt.

2.2.6 Mitochondrienpräparation aus Fettzellen

Methode nach Löffler (46)

Die Zellen wurden wie oben noch zweimal, aber mit Sucrose-Medium (0,25 M Sucrose, 7,5 mM Gluthation; 2 mM EDTA; 20 mM Tris; 2 % BSA; pH 7,4 bei 37° C) gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 0° - 4° C. Zu den Zellen aus dem Überstand wurde das doppelte Volumen Sucrose-Medium (pH 7,4 bei 5° C eingestellt) gegeben und das Gemisch in einem Glas-Teflon-Potter unter zweimaligem Auf- und Abfahren des Stempels homogenisiert. Alle Zentrifugationen erfolgten in der Sorvall RC 5B Zentrifuge. Nach 1 min. bei 3 000 g wurde die flüssige Phase (unter dem fettigen Überstand) 7 min. bei 10 000 g zentrifugiert, das Pellet in Sucrose-Medium aufgenommen

und noch einmal bei 10 000 g 7 min. lang zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in KCl-Medium (130 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 2 mM EDTA; 2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Tris; 0,5 % BSA; pH 7,4 bei 5° C) aufgenommen und ein letztes Mal bei 10 000 g 7 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde durch dreimaliges Auf- und Abfahren im Glas-Teflon-Potter mit demselben Puffer (1,2 ml pro 14 g Frischgewebe) resuspendiert.

2.2.7 Herstellung von Fettzell-Homogenaten und Mitochondrienextrakten zur PDH-Bestimmung

Zellen

Nachdem die Zellen auf Dinonylphthalat gegeben worden waren (3.3.2), erfolgte eine Zentrifugation von 2 sec. in der Tischzentrifuge. Anschließend wurde das Cup in flüssigen N_2 gegeben. Unmittelbar nach Entnahme wurden die zelligen Überstände der gefrorenen Proben vom Öl abgeklopft, mit 400 μl Tris-Lubrol (15 mM Tris pH 7,0 bei 5° C; 0,2 % Lubrol) und 5 % Rattenserum sowie 3,5 ml Silikonöl zusammengegeben und im Eisbad im Ultra-Turrax 2 x 20 sec. mit 20 sec. Pause aufgeschlossen, 1 min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die mittlere Phase in den AAtase-Test eingesetzt.

Mitochondrien

50 μl der nach 2.2.6 gewonnenen Mitochondriensuspension wurden 9 min. bei 25° C in einem Endvolumen von 250 μl inkubiert (Inkubationsmedium im jeweiligen Versuch angegeben), 1 min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in flüssigen N_2 gege-

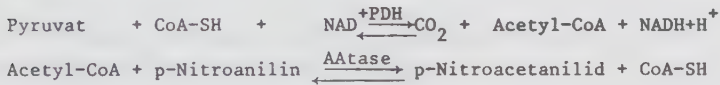
ben. Zum Pellet wurden 100 μ l Tris-Lubrol pipettiert, auf dem Rüttler mit Hilfe eines Einmalspatels aufgetaut, in flüssigen N_2 geworfen, wie eben getaut, noch einmal gefroren und nach dem folgenden Tauen in den Test eingesetzt.

Für zu vergleichende Werte wurden nur Mitochondrien aus einer einheitlichen Präparation verwandt.

2.2.8 Bestimmung von aktiver Form (PDH_a) und PDH -Gesamtaktivität

AAtase-Test (80)

Testprinzip:



Durch Umwandlung des p-Nitroanilin ergibt sich eine Farbabschwächung, die photometrisch gemessen werden kann.

In eine 250 μ l Glasküvette waren vorpipettiert: 200 μ l Gemisch (6,5 mM Tris-HCl pH 8,2; pNA 0,195 mM; MET 13 mM; 0,5 mM $MgCl_2$; 1,3 mM TPP; 1,3 mM NAD^+ ; 25 mM Pyruvat; 0,125 mM CoA). Dazu wurden 50 μ l Probe gegeben und 30 μ l AAtase zum Start. Bei 405 nm wurde die Absorption am Eppendorf-Photometer gemessen.

Aus jeder Probe wurden zwei Meßgrößen bestimmt:

1. die in der Probe tatsächlich vorhandene PDH_a , wie oben beschrieben,
2. die in der Probe enthaltene gesamte PDH , d.h. die Summe aus aktiver und inaktiver Form. Dazu wurden 20 μ l Phosphatase mit 10 μ l H_2O , 5 μ l 110 mM $MgCl_2$ und 20 μ l Phosphatase 15 min. bei 25° C inkubiert. In dieser Zeit

erfolgte eine vollständige Umwandlung der vorhandenen PDH in die aktive Form, die im AAtase-Test gemessen werden konnte.

Aus beiden Größen wurde ein Quotient gebildet, der den Anteil der aktiven Form an der gesamten, in der Probe vorhandenen PDH in Prozent angibt.

Proteinbestimmung nach Biuret (3)

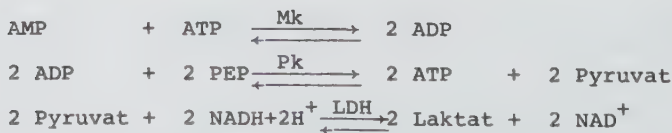
Als Standard wurde Lab-trol E mitgeführt, verdünnt 1 : 5 in 0,9 % NaCl. Die Proben wurden zunächst zur Entfernung der Lipide im Rüttler 10 min. mit 1 ml Dioxan geschüttelt, 2 min. in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, zur Fällung der Proteine 0,3 M TCA (1 ml) zugegeben, 5 min. geschüttelt, zum Pellet nach erneuter zweiminütiger Zentrifugation Biuret-Reagenz (1 ml) zugegeben und nach 30 min. schütteln bei 546 nm am Eppendorf-Photometer gegen einen Leerwert (0,9 % NaCl, 1 : 5 verdünnt, kein Protein) gemessen.

2.2.9 Bestimmung der Adeninnukleotide AMP und ADP (33)

AMP

Bei der Messung wird AMP in ADP übergeführt.

Prinzip:

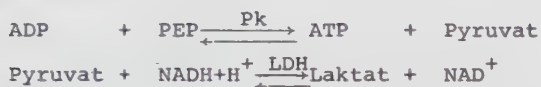


Die Messung erfolgte am Eppendorf-Photometer bei 334 nm.

Zu einem Gemisch aus 0,1 ml TRAM (0,43 M pH 7,6), 75 μ l Gemisch (14 mM PEP; 0,5 MgSO_4 ; 1,8 M KCl), 5 μ l Laktatdehydrogenase (5 mg/ml, verdünnt 1 : 10), 35 μ l NADH 1 mM, 10 μ l 5 mM ATP wurden 25 μ l Probe gegeben. Nach 10 μ l Pyruvatkinase (10 mg/ml) wurden 25 μ l Myokinase (5 mg/ml, verdünnt 1 : 10) zugegeben. Ausgewertet wurde anhand einer Eichkurve.

ADP

Prinzip:



Die Messung erfolgte am Spektrofluorometer bei 340 nm Anregung und 435 nm Abstrahlung.

Von einem Testgemisch (20 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 μ l NADH 1 mM; 10 μ l Laktatdehydrogenase 10 mg/ml; 700 μ l MgSO_4 0,37 M; 1 ml PEP 13,6 mg/ml; 1400 μ l KCl 200 mg/ml) wurde 1 ml in eine Küvette gegeben, 10 μ l Probe und 5 μ l NADH 10 mM zugegeben. Gestartet wurde mit Pyruvatkinase 10 mg/ml, 1 : 10 verdünnt, 10 μ l. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve.

3. ERGEBNISSE

3.1 Versuche zur Herstellung isolierter Plazentazellen

Der Versuch, das Gewebe mit den Versuchsbedingungen der Fettgewebsverdauung mit Kollagenase in Einzelzellen aufzulösen, führte zu keinem Ergebnis. Unter dem Lichtmikroskop konnten nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (bis zu 3 Stunden) und bei unterschiedlichen Kollagenasekonzentrationen (bis zum Doppelten im Vergleich zum Fettgewebe) höchstens vereinzelt Plazentazellen, jedoch viele Erythrozyten, gesehen werden. Die folgenden Versuche wurden deshalb mit Gewebstückchen von Plazenta durchgeführt.

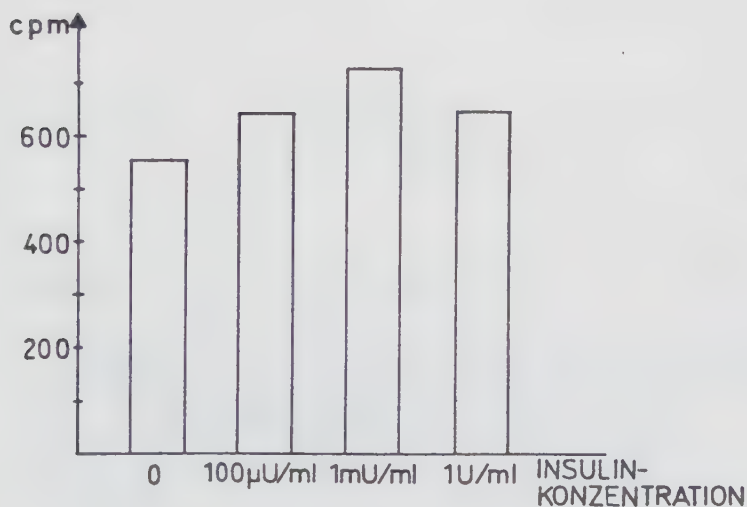
3.1.1 $U-^{14}C$ -Glukoseoxidation durch Plazentagewebe

In Versuchen mit Insulinkonzentrationen von 1 $\mu U/ml$ bis 1 mU/ml bei 45 min. Inkubationszeit, ebenso unter sonst gleichen Bedingungen mit 100 $\mu U/ml$ bis 1 U/ml und 2 Stunden Inkubationszeit, wurde die Insulinabhängigkeit der Glukoseaufnahme untersucht. Diese Versuche brachten, wie eine Zeitabhängigkeit mit bis zu 60 min. Inkubationszeit, keine signifikanten Unterschiede zu den insulinfreien Kontrollen.

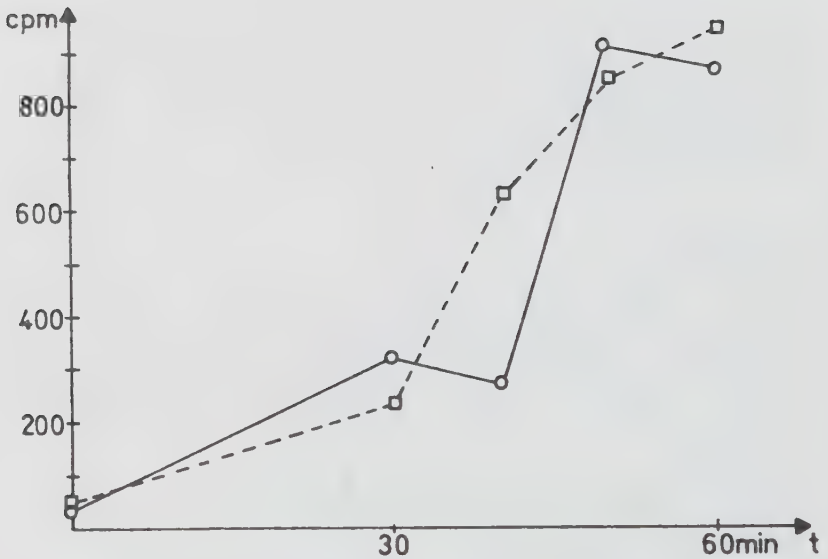
Freundlicherweise bestimmte Dr. T. Urumow die Insulinkonzentration vor und nach der Inkubationszeit im Ansatz mit einem RIA (Methode nach (22)). Nach zwei Stunden Inkubation konnte bei einer gemessenen Ausgangskonzentration von 35 $\mu U/ml$ und 225 $\mu U/ml$ kein Insulin mehr nachgewiesen werden.

3.1.2 PDH-Aktivität der Plazenta

Aus insgesamt 9 Plazenten wurde die Aktivität der PDH bestimmt. Dabei wurden zur Bestimmung von Hämoglobin, Protein und Pyruvatdehydrogenase für jede Plazenta die Mittelwerte aus 4 Parallelbestimmungen gebildet. Wie Tabelle 2 zeigt, ergab sich eine spezifische Aktivität von 2,7 mU/mg Gewebe $\pm$ 0,75.



Figur 4: Abhängigkeit der U-¹⁴C-Glukoseoxidation von der Insulinkonzentration bei Plazentagewebsstückchen. Inkubationsbedingungen: 200 mg Gewebe; 2 ml 1,25 % BSA HEPES; 3,7 mM Glukose; 0,1 µCi/ml ¹⁴C-Glukose. Abszisse: Insulinkonz. Ordinate: counts per minute im Packard-Zähler. t = 45 min. bei 37° C im Schüttelbad, 50 Anschläge/min. Proben vor Inkubation mit Carbogen begast. 3 parallele Ansätze, daraus Mittelwert.



Figur 5: Zeitabhängigkeit der U-¹⁴C-Glukoseoxidation bei Plazentagewebsstückchen. 1 repräsentativer Versuch (Versuchsbedingungen wie Figur 4)
o-o ohne Insulin □-□ 1 mU/ml Insulin.
Jeder Wert ist Mittelwert aus je 2 Parallelansätzen.

Tabelle 2: PDH-Aktivität der Plazenta

Plazenta	PDH _a	PDH Totalaktivität	PDH, % der Gesamtaktivität	Blutprotein	Plazenta- protein	spez. Aktivität
1	210	mU/ml 245	mU/ml 86	6,4 mg/ml	61,8 mg/ml	4,0 mU/mg
2	194	mU/ml 180,1	mU/ml 100	7,2 mg/ml	59,7 mg/ml	3,0 mU/mg
3	150	mU/ml 144	mU/ml 100	8,5 mg/ml	69,5 mg/ml	2,1 mU/mg
4	178	mU/ml 206	mU/ml 86	5,0 mg/ml	58,4 mg/ml	3,5 mU/mg
5	84,4	mU/ml 124,6	mU/ml 68	13,5 mg/ml	71,1 mg/ml	1,8 mU/mg
6	98,4	mU/ml 142	mU/ml 64	3,5 mg/ml	71,5 mg/ml	2,0 mU/mg
7	150	mU/ml 196	mU/ml 77	4,5 mg/ml	66,6 mg/ml	3,0 mU/mg
8	182	mU/ml 213	mU/ml 85	3,5 mg/ml	74,7 mg/ml	2,9 mU/mg
9	129	mU/ml 130	mU/ml 100	8,7 mg/ml	60,6 mg/ml	2,2 mU/mg

2,7±0,75 mU/mg
Frischgewebe

Bestimmung, wie in Methoden angegeben, jeder Tabellenwert ist Mittelwert aus 4 Parallelbestimmungen

3.1.3 Diskussion

Die vorliegenden Versuche konnten keine Insulinwirkung auf die Plazenta, gemessen an der U-¹⁴C-Glukoseoxidation, nachweisen. Dies deckt sich mit den Befunden von Szabo (79), jedoch beobachtete Demers (14) eine Steigerung der ¹⁴CO₂-Produktion von 36 % - 47 % durch Insulin. Auch Villée (84) und Freinkel (20) berichten von ähnlichen Ergebnissen. Unterschiede in der Glukoseverwertung zwischen fötaler und maternaler Seite sind nicht vorhanden; selbst wenn das Gewebe 60 min. bei Raumtemperatur stehenbleibt, fällt sie um höchstens 20 % ab (84). Jedoch nimmt die Glukoseverwertung bei reifen Plazenten gegenüber nicht ausgereiften deutlich ab (84).

In allen Arbeiten fallen die hohen Insulinkonzentrationen (Größenordnung 1 E/ml) und die langen Inkubationszeiten (mehrere Stunden) auf.

Hohe Insulinaseaktivitäten in Plazentagewebe (14), (20), (79) und Erythrozyten (41), (83) sind wahrscheinlich die Ursache, daß nach 2 Stunden Inkubation kein Insulin mehr nachgewiesen werden konnte. Damit könnte auch der fehlende Insulineffekt zusammenhängen, jedoch wurde dies nicht weiter untersucht. In jedem Fall scheint jedoch Plazentagewebe, wenn überhaupt, nur geringe Insulinsensitivität zu besitzen und wurde deshalb als Alternative zu Fettgewebe für die weiteren Arbeiten nicht in Betracht gezogen.

Die spezifische Aktivität der PDH der Plazenta von 2,7 mU/mg Protein liegt niedrig, wenn man sie z.B. mit der von Ratten-Gastrocnemius-Muskel (15 mU/mg Protein (25)), Rattenfettgewebe (5 mU/mg Protein (73)), Rattenleber (4 mU/mg Protein (94)) und Rattenhoden (7 mU/mg Protein (3.2.1)) vergleicht. Der hohe Anteil an PDH_a (65 % - 100 %) ist wahrscheinlich auf Dephosphorylierung während der Präparation der Gewebsextrakte zurückzuführen.

3.2 Hodengewebe, U-¹⁴C-Glukoseoxidation

Nach 10 min. Vorinkubation und 30 min. Inkubation bei 37° C im Schüttelbad von Rattenhodengewebe über einen Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 µU/ml Insulin ergab sich im Vergleich zur insulinfreien Kontrolle keine Aktivierungsrate (Tabelle 3).

Tabelle 3: U-¹⁴C-Glukoseoxidation von Rattenhodengewebe

Anzahl der Hoden	2	2	4	5	5	3	3
Anzahl der Bestimmungen	6	6	12	14	15	9	9
µU/ml Insulin	1	5	10	50	100	500	1000
¹⁴ CO ₂ -Produktion (insulinfreie Kontrolle = 100 %)	91,8±6,6	109,9±9,9	109,3±20,8	106,1±15	93,3±13,3	105,1±13,5	99,5±16,7

10 min. Vorinkubation, 30 min. Inkubation bei 37° C und 120 Anschlägen/min. im Schüttelbad. Bedingungen sonst wie unter 2.2.4.1

3.2.1 PDH-Aktivität von Rattenhodengewebe

Aus 3 Hoden verschiedener Tiere mit jeweils 4 Parallelbestimmungen ergab sich eine Gesamtaktivität von 7,3 ± 2,4 mU/mg Protein bzw. 1,83 ± 0,43 mU/mg Frischgewebe. Der Anteil an PDH_a betrug 39,8 ± 6,8 %.

3.2.2 Diskussion

Der Nachweis von Insulinrezeptoren des Hodengewebes, die Schädigung testikulärer Zellen durch insulininduzierte Hypoglykämie und Hodenatrophie bei unbehandeltem Diabetes mellitus deuten an, daß Insulin eine Rolle bei der Glukoseaufnahme spielen könnte (66). Interkonvertierung der PDH wurde in Hodengewebe nachgewiesen (19). Eine Insulinabhängigkeit der U-¹⁴C-Glukoseoxidation konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Die Basalaktivität der PDH erwies sich mit 40 % als wesentlich höher wie z.B. bei Fettgewebe. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit Free (19).

3.3 Versuche mit isolierten Fettzellen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, soll Insulin in Fettzellen zur Bildung eines niedermolekularen Peptids führen, das als second messenger verschiedener Insulin-effekte, darunter auch der PDH-Aktivierung, fungiert. Im folgenden wurde versucht, die Existenz dieser Substanz zu bestätigen. Hierzu wurden isolierte Rattenfettzellen mit Insulin inkubiert, aufgeschlossen und die Extrakte auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die PDH isolierter Fettzellmitochondrien zu aktivieren.

3.3.1 Effekt von Insulin auf die PDH-Aktivität intakter Fettzellen

Es wurde zunächst geprüft, ob die Fettzellen, wie in der Literatur beschrieben, auf Insulin mit einer Umwandlung der inaktiven Form der PDH (PDH_b) in die aktive Form (PDH_a) reagieren. Wie Tabelle 4 zeigt, war dies der Fall. Der Aktivierungseffekt von $17,3 \pm 6,2 \% \text{PDH}_a$ auf $42,6 \pm 9,3 \% \text{PDH}_a$ liegt im selben Bereich, wie er auch von anderen Autoren gefunden wurde (16), (86), (97). (Gewisse Abweichungen können vor allem durch unterschiedliche Kollagenasechargen erklärt werden.)

Tabelle 4: Wirkung von Insulin auf die PDH-Aktivitäten isolierter Fettzellen

	Kontrolle	Insulin 100 $\mu\text{U/ml}$
PDH_a	$17,3 \pm 6,2$	$42,6 \pm 9,3$
(in % der $\text{PDH}_{\text{total}}$)	$n = 17$	$n = 17$

Methodik wie unter 3.3.2

3.3.2 Wirkung von Fettzellextrakten auf die PDH-Aktivität isolierter Fettzellmitochondrien

6 ml gepackte Zellen wurden in 14 ml 2,5 % BSA HEPES (Zusammensetzung s. 2.2.5) und 1 mM Glukose 5 min. bei 37° C im Schüttelbad (120 Anschläge/min.) mit und ohne 100 µU/ml Insulin inkubiert. Nach Zusatz von EGTA (756 µl einer 59 mM Lösung, mit KHCO_3 neutralisiert) wurden die Ansätze 10 sec. bei 100 g zentrifugiert und der unter der Zellschicht befindliche Unterstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Auf die gleiche Weise wurden die Zellen dreimal mit 1,25 % BSA HEPES (Zusammensetzung s. 2.2.5) in der Zentrifuge gewaschen. Von den Zellen wurden 4 x 300 µl zur Messung der PDH auf 200 µl Dinonylphthalat gegeben, um die Insulinstimulierung zu prüfen. Das weitere Vorgehen ist unter 2.2.5 beschrieben.

Zum Aufschluß wurden 2 x 2,3 ml der übrigen Zellen zu je 1,38 ml eiskaltem KCl-Puffer (130 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 2 mM EDTA; 2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Tris; pH 7,4 bei 5° C) und 1 ml Silikonöl AK 20 gegeben. Dieses Gemisch wurde durch dreimaliges Auf- und Abfahren im Glas-Teflon-Potter homogenisiert und anschließend in Eppendorf-Cups abgefüllt. Nach 1 min. Zentrifugation bei 8000 g in der Eppendorf-Tischzentrifuge waren 3 Phasen erkennbar: eine obere, ölig-fettige, eine mittlere, wässrige und eine untere, feste, bestehend aus subzellulären Partikeln. Mit einer 1-ml-Insulinspritze wurde die mittlere Phase vorsichtig abgesaugt und 8 min. lang im kochenden Wasserbad in gut verschlossenen Eppendorf-Cups belassen.

Ausgefälltes Protein wurde durch zweiminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand,

der den laut Literatur hitzestabilen Insulin-Mediator enthalten sollte, wurde bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem N₂ aufbewahrt.

Die PDH-aktivierende Wirkung der so gewonnenen Extrakte wurde an isolierten Fettzellmitochondrien der Ratte geprüft. Herstellung der Mitochondrien, Mitochondrienaufschluß und Messung der aktiven Form und der Gesamtaktivität der PDH im AATase-Test sind im Methodenteil (2.2.6, 2.2.7, 2.2.8) beschrieben. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis aus insgesamt 79 Experimenten.

Tabelle 5: Effekt von Fettzellextrakten auf die PDH-Aktivität isolierter Fettzellmitochondrien

Extrakt nach Zellinkubation	% PDH _a /total	Faktor	n
ohne Insulin	31,9 ± 2,7		79
mit Insulin	44,1 ± 2,7*	1,38	79

*p < 0.0005

Je 6 ml gepackte Zellen wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben, mit und ohne Insulin inkubiert und homogenisiert. Von den Extrakten wurden je 50 µl zu je 50 µl Fettzellmitochondrien zugesetzt und nach 9 min. Inkubation bei 25° C die PDH-Aktivität gemessen. Bezüglich der Mitochondrienherstellung, Zusammensetzung der Inkubationsansätze und PDH-Bestimmung siehe Methodenteil (2.2.6, 2.2.7, 2.2.8). In Mitochondrien nach Inkubation ohne Zellextrakte betrug die PDH_a im Mittel ca. 10 % der Gesamtaktivität.

Demnach führten die Extrakte insulinbehandelter Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ohne Insulin im Mittel zu einer etwa 40 %igen Aktivierung der PDH. Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant, wenn auch viel geringer als der Effekt des Insulins an intakten Fettzellen mit einer durchschnittlichen Aktivierung der PDH um etwa 300 %.

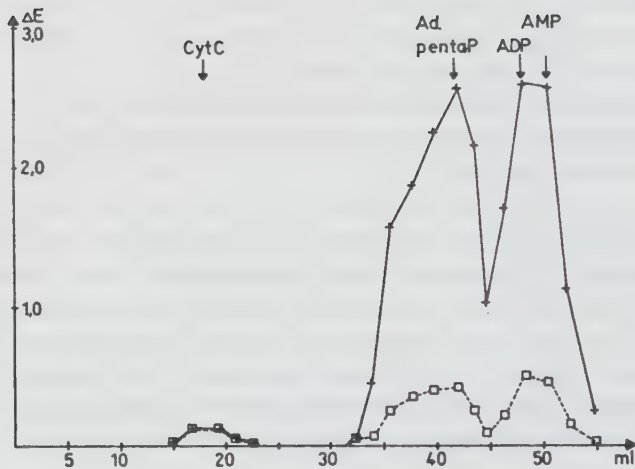
Aus den Ergebnissen der Tabelle 5 ist auch zu entnehmen, daß schon in Extrakten normaler Fettzellen (ein) hitzestabile(r) PDH-aktivierende(r) Faktor(en) enthalten sind (ist). Zur weiteren Reinigung und Charakterisierung der Faktoren wurden nur Extrakte verwendet, die, bezogen auf die nicht insulinstimulierten Kontrollen, eine Steigerung der PDH-Aktivität um mindestens 40 % bewirkten.

3.3.3 Säulenchromatographie der Zellextrakte an Sephadex G-25 fine

Einen ersten Reinigungsschritt des Mediators sollte nach Angaben in der Literatur eine Säulenchromatographie an Sephadex G-25 fine bringen. Das Elutionsprofil eines Fettzellextrakts ohne Insulin-Vorinkubation, gemessen bei 260 und 280 nm, zeigt Figur 7.

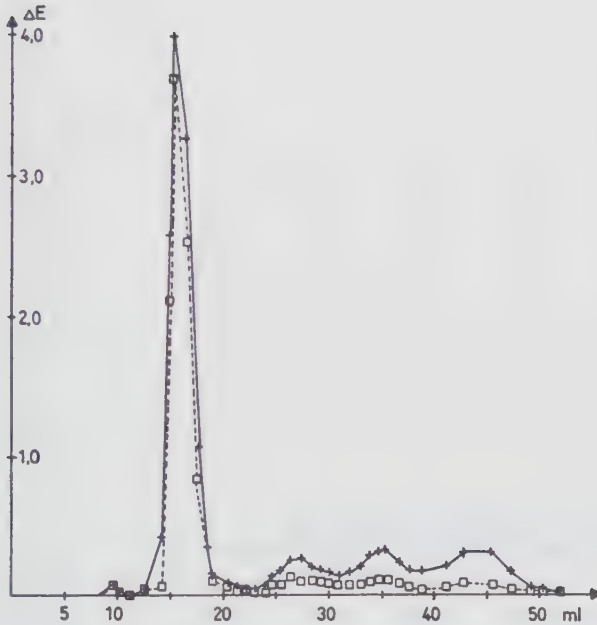
Bei beiden Wellenlängen sind nach einem prominenten Gipfel im Ausschlußvolumen noch 3 kleinere, deutlich getrennte Gipfel zu erkennen.

Ein weitgehend ähnliches Bild ergab die Chromatographie eines Extraktes insulinbehandelter Fettzellen (Figur 8).

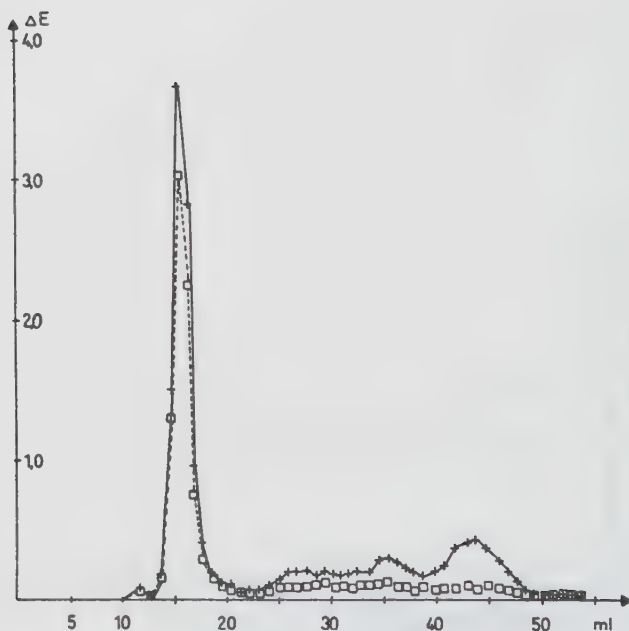


Figur 6: Eichung der Sephadex G-25 fine Säule. Durchmesser 1 cm; $V = 41,3 \text{ cm}^3$. Temperatur 4°C ; Füllung: 24 h im Eluationsmedium (KCl-Puffer: 130 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 2 mM EDTA; 2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Tris; pH 7,4 bei 50°C) vorgequollenes Sephadex G-25 fine. Aufgetragen wurden: je 100 μl Cytochrom C, Adenosinpentaphosphat, ADP, AMP, je 5 mg/ml. Die Fraktionen wurden bei 260 nm x-x-x und 280 nm $\square-\square-\square$ gemessen. Auf der Abszisse sind ml Eluationsvolumina aufgetragen.

Im folgenden wurden je zwei aufeinanderfolgende Fraktionen zusammengegeben und auf PDH-Aktivierung im Mitochondrientest untersucht. Wie Figur 9 a und b zeigen, war die höchste Wirksamkeit im Bereich der Fraktionen 35 - 50 ml enthalten. Die beiden Gipfel der PDH-Aktivierung (15 und 28 ml) bei den Extrakten der insulinstimulierten

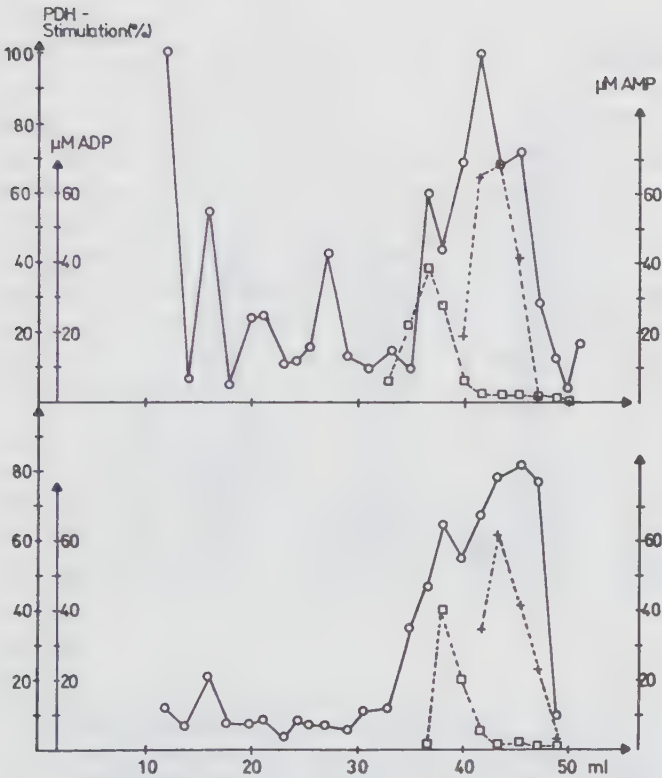


Figur 7: Sephadex G-25 fine Chromatographie eines Extraktes von insulinfrei inkubierten Fettzellen.
Absorption des Eluats bei 260 nm x-x-x und 280 nm $\square-\square-\square$.
2 ml einer Extraktpräparation waren aufgetragen worden. Für weitere experimentelle Einzelheiten siehe Figur 6.

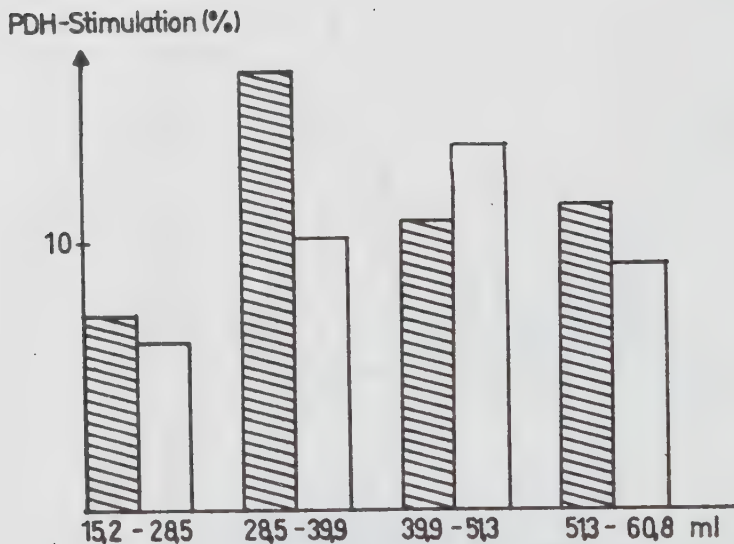


Figur 8: Absorption eines Extraktes insulinbehandelter Fettzellen bei 260 nm x-x-x und 280 nm □-□-□. Gemessen wurden die Eluate von der Sephadex G-25 fine Säule. Es waren 2 ml der Präparation aufgetragen worden. Für weitere Einzelheiten s. Figur 7.

Zellen in Figur 9a ließen sich nicht reproduzieren. Im übrigen sind keine auffallenden Unterschiede zu den Kontrollzellen zu sehen.

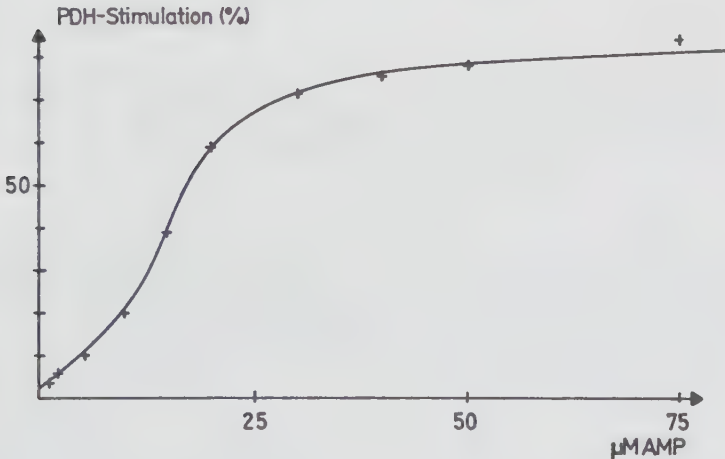


Figur 9a und 9b: Effekte der von der Sephadex-Säule gewonnenen Eluate auf die PDH-Aktivität isolierter Fettzell-Mitochondrien. Gehalt von AMP und ADP in den Fraktionen. Oben: Extrakt insulinbehandelter Zellen; unten: Kontrollextrakt. Jeweils zwei aufeinanderfolgende Fraktionen (Volumen je Fraktion 0,85 ml) wurden zusammengegeben und an isolierten Fettzellmitochondrien getestet. Alle Mitochondrien stammen aus einer Präparation. o-o PDH-Aktivität □-□ ADP x-x AMP Absorptionsprofile siehe Figur 7 und 8.



Figur 10: Fraktionen von Sephadex G-25 feine Säule gepoolt, lyophilisiert und in 1/5 des ursprünglichen Volumens aufgenommen (Elutionspuffer auf 1/5 verdünnt). Diese gepoolten Fraktionen wurden an Fettzellmitochondrien getestet. Kontrollen schraffiert, Insulin offen. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen angegeben (in ml), auf der Ordinate die Prozentzahl aktiver PDH im Verhältnis zur gesamten im Ansatz vorhandenen PDH.
 Kontrollextrakt vor Säulentrennung: 30,9 % PDH_a
 Extrakt insulinbehandelter Zellen: 44,9 % PDH_a
 Extrakt ist nicht identisch mit dem in Figur 9!

Auch in höheren Konzentrationen zeigten die Fraktionen aus insulinbehandelten Fettzellen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen (Figur 10), die Effekte der entsprechenden Fraktionen in Figur 9a und b sind praktisch völlig verschwunden. Ausgehend von der Überlegung, daß der Mediator für seine Stimulierung einen optimalen Konzentrationsbereich hat und möglicherweise in einer darüber liegenden Konzentration wieder hemmend wirken bzw. ein Inhibitor konzentriert werden könnte, wurden die Extrakte in verschiedenen Verdünnungsstufen in das Mitochondriensystem eingesetzt. Verdünnungen bis 1:100 wurden getestet. Eine Gesetzmäßigkeit, wie sich der Insulineffekt dabei entwickelt, konnte nicht erkannt werden.



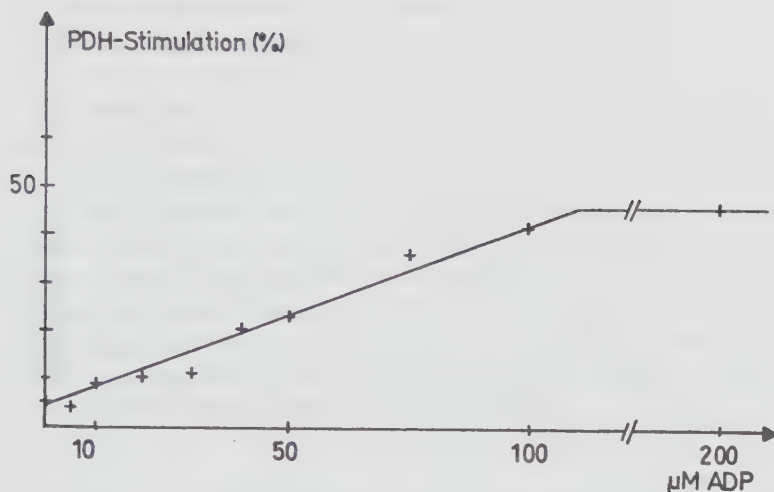
Figur 11: Abhängigkeit der mitochondrialen PDH-Aktivität von der AMP-Konzentration im Inkubationsmedium. Inkubiert wurden: 50 μl Mitochondrien-suspension in 200 μl KCl (130 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 2 mM EDTA; 2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Tris; 0,5 % BSA; pH 7,4 bei 50° C). 9 min. bei 25° C

3.3.4 AMP und ADP als mögliche Aktivatoren

In den PDH-aktivierenden Fraktionen wurde auch der Gehalt von AMP und ADP bestimmt. Die Werte sind ebenfalls in Figur 9 dargestellt. Aus der weitgehenden Kongruenz zwischen der Adeninnukleotidverteilung und der PDH-Aktivierung könnte man schließen, daß AMP und ADP die wirk-samen Faktoren sind. Es wurde deshalb untersucht, ob Zu-satz von AMP oder ADP im Mitochondrientest zu einer Er-höhung der PDH_a-Aktivität führt.

3.3.4.1 Versuche mit AMP- und ADP-Standardlösungen

Wie aus Figur 11 ersichtlich wird, setzte eine deutliche Aktivierung der PDH bei AMP-Konzentrationen $> 4 \mu\text{M}$ ein, bei ADP bei Konzentrationen $> 30 \mu\text{M}$ (Figur 12). Wurden AMP und ADP in Zellextrakte eingewogen und die Proben anschließend gemessen, so konnten diese beiden Nukleo-tide im getesteten Konzentrationsbereich (bis $100 \mu\text{M}$) quantitativ wiedergefunden werden. Die in Figur 9 an-gegebenen ADP- und AMP-Konzentrationen der Zellextrakte könnten demnach die beobachteten PDH-Aktivierungen er-klären. Allerdings waren keine bemerkenswerten Unter-schiede der Konzentrationen von AMP und ADP zwischen insulinbehandelten und nicht insulinvorbehandelten Extrakten nachzuweisen.



Figur 12: Abhängigkeit der mitochondrialen PDH-Aktivität von der ADP-Konzentration im Inkubationsmedium (Inkubationsbedingungen wie in Figur 11).

Tabelle 6: PDH-Aktivierung durch Zellextrakte mit (+) und ohne (-) Vorbehandlung mit Aktivkohle

Kontrollen		Insulin-behandelt	
(-)	(+)	(-)	(+)
19,6 $\pm$ 5,9	9,7 $\pm$ 1,6	40,0 $\pm$ 5,3	11,7 $\pm$ 1,8

Mittelwerte $\pm$ SD für % PDH_a/total aus 7 Versuchen. Die Kohle wurde mit 2 N HCl gekocht, mit H₂O bis zum neutralen pH ausgewaschen, mit 10 mM KCN zur Entfernung des restlichen Eisens nachgewaschen (ionen- und KCN-frei). Pro 100 μl Zellsaft wurden 10 mg eingesetzt.

3.3.4.2 Effekt der Behandlung der Extrakte mit Tierkohle

Der in der Literatur beschriebene Insulinmediator soll nicht an Aktivkohle gebunden werden. Es wurde deshalb geprüft, ob Vorbehandlung der Fettzellextrakte mit Aktivkohle ihre Wirksamkeit beeinflußt. Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die PDH-stimulierende Aktivität sowohl von Kontrollextrakten, als auch von Extrakten insulinbehandelter Zellen nach Kohlebehandlung völlig verlorengeht. Da Adeninnukleotide stark an Kohle absorbiert werden, ist es sehr wahrscheinlich, daß das in den Extrakten enthaltene ADP und AMP größtenteils für die Aktivierung der PDH verantwortlich ist. Was die höhere Aktivität von Extrakten insulinbehandelter Zellen betrifft, so müssen auch dafür an Kohle adsorbierbare, nicht näher definierte Substanzen (Nukleotide?) verantwortlich sein.

Somit konnte aus den bisherigen Versuchen kein Anhalt für die Existenz des beschriebenen Peptidmediators gefunden werden.

3.3.5 Untersuchung verschiedener Zellaufschlußverfahren

Um zu besser reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen, wurden anstelle der Homogenisation im Potter-Homogenisator verschiedene andere Aufschlußverfahren untersucht.

Ultra-Turrax

Wurden die Zellen am Ultra-Turrax aufgeschlossen und die PDH-Aktivität im Homogenat gemessen, so ergab sich in einem typischen Experiment für die Kontrolle 13,7 %, für die insulinbehandelten Zellen 32,6 % aktive PDH. Wurden diese Homogenate wie in 3.3.2 weiterbehandelt und die Extrakte mit isolierten Mitochondrien getestet, war kein

Insulineffekt mehr festzustellen. In insgesamt vier Ansätzen wurden jeweils Proben nach der Standardmethode zum Vergleich mitgeführt.

Dismembrator

Die mit Fettzellen beschickte Kammer wurde zur Kühlung in flüssigen N_2 getaucht und erst dann in den Dismembrator eingespannt. Das aus 1 ml Zellen gewonnene Homogenat wurde in 800 μ l Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (15 mM) aufgenommen. Wurde die PDH darin direkt gemessen, ergaben sich gute Insulineffekte (Tabelle 7). Die Weiterbehandlung zu Zellextrakten führte jedoch dazu, daß die Kontrollen höhere Aktivierungen als die Insulinproben zeigten, ein Ergebnis, das nicht erklärt werden konnte.

Tabelle 7: Zellaufschluß am Dismembrator

Zeit	PDH _a , Zellen		PDH _a , Mitochondrien-system	
	Kontrolle	Insulin	Kontrolle	Insulin
2 x 20 sec.	3,0 %	35,1 %	64,0 %	43,3 %
3 x 20 sec.	10,5 % 13,1 %	23,4 % 29,8 %	25,3 %	35,9 %
4 x 20 sec.	5,6 % 12,8 % 13,4 %	47,3 % 25,7 % 22,0 %	33,0 % 45,1 %	15,4 % gekocht 60,0 % ungekocht

1 ml gepackte Zellen wurden mit 15 mM Tris/HCl pH 7,5 (800 μ l) aufgeschlossen. Neben der Dauer der Behandlung sind die relativen PDH-Aktivitäten für Kontrolle und Insulin, gemessen in Zellen bzw. in Mitochondrien mit Extraktzusatz (Mitochondriensystem), angegeben.

Im weiteren Verlauf dieser Präparation wurde versucht, die Fällung der Proteine nicht durch Kochen, sondern durch Äthanol oder Azeton vorzunehmen. Jeweils 740 μ l Extrakt wurden zu je 4 ml -20° C kaltem Äthanol bzw. Azeton gegeben und abzentrifugiert. Aus den Überständen wurde durch Eindampfen im Rotationsverdampfer das Azeton bzw. Äthanol entfernt und die festen Rückstände in 740 μ l H_2O aufgenommen. Das Pellet wurde nach vollständigem Abblasen des Azetons bzw. Äthanols in 1,67 ml KCl-Puffer aufgenommen. Proben davon (50 μ l) wurden in das Mitochondriensystem eingesetzt.

Jeweils nach der Standardmethode präparierte Extrakte wurden mitgeführt. Keine Effekte konnten bei Äthanol (Kontrolle 26,8 %, Insulin 22,8 %) und Azeton (Kontrolle 77,9 %, Insulin 66,7 %) gefunden werden. Die Zellhomogenate selbst nach dem Dismembrator-Aufschluß zeigten in den Kontrollen 45,1 % und nach Insulin 60 % an aktiver PDH.

Wurde im Dismembrator mit KCl-Medium aufgeschlossen, erwiesen sich die Kontrollen als deutlich höher:

ungekocht: Kontrollen 42,8 %, Insulin 36,2 %

gekocht: Kontrollen 31,4 %, Insulin 22,6 %

Die PDH wurde in jeweils 3 Parallelansätzen bestimmt und der Mittelwert gebildet.

Andere Modifikationen

An weiteren Modifikationen wurden untersucht:

- Änderung des Waschmediums der Zellen, vor allem unter Einschluß von Insulin und Glukose,
- Filtration der Extrakte an Kollodiumhülsen zur Entfernung hochmolekularer Verbindungen (anstatt Erhitzen),

- Zusatz von Sulfhydrylreagentien. Letzteres wurde versucht, da die PDH-aktivierende Wirkung der Extrakte insulinbehandelter Zellen offenbar im Laufe der Extraktbehandlung verloren ging. Da hierbei am ehesten an Oxidationsvorgänge zu denken war, wurden als Oxidationsschutz vor dem Kochen der Extrakte Dithioerythrit, 0,1 mM, oder CoA-SH, 0,1 mM, oder Mercaptoäthanol, 15 mM, zugesetzt.

Keine der obengenannten Modifikationen erwies sich als erfolgreich.

3.4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach einem niedermolekularen, peptidartigen Faktor von MG 1000 - 2000, der nach Literaturberichten als "second messenger" verschiedener intrazellulärer Insulinwirkungen, wie Aktivierung der Glykogensynthese (42), des PDH-Komplexes (68) und der cAMP-Phosphodiesterase (55) dienen soll. Ein solcher Faktor wurde aus Skelettmuskel (42), Fettzellen (68), Leber- (63) und Hepatomzellen (55) und Lymphozyten (31) gewonnen. Er soll durch Insulinkonzentrationen im physiologischen Bereich erzeugt werden und hitzestabil, säurestabil sowie nicht an Kohle adsorbierbar sein. Die meisten der bisherigen Arbeiten beschäftigten sich mit der Bildung des Peptidmediators in Fettzellen und seiner Wirkung auf das mitochondriale PDH-System. Zu isolierten Mitochondrien zugesetzte Präparate führten im allgemeinen zu relativ bescheidenen Effekten (30 - 40 %), gemessen an den Effekten des Insulins an intakten Fettzellen (300 - 400 %). Für die Umwandlung von inaktiver PDH (PDH_b) in die aktive Form (PDH_a) wurde eine Aktivierung der PDH_b -Phosphatase durch den Faktor angenommen (39).

Angesichts der potentiellen Tragweite dieser Beobachtungen für das Verständnis der Insulinwirkung schien es von großem Interesse, der Existenz eines solchen Mediators nachzugehen. Auf der Suche nach Ausgangsgeweben, die sich für präparative Zwecke besser eignen würden als Fettgewebe, wurden zunächst Plazenta- und Hodengewebe untersucht, allerdings ohne Erfolg, da sich beides als insulinunempfindlich erwies. Alle weiteren Versuche wurden deshalb mit isolierten Rattenfettzellen durchgeführt.

Nach den vorliegenden Ergebnissen konnte kein Hinweis für einen Faktor gewonnen werden, der den Kriterien des postulierten Peptidmediators entspricht. Es wurden insgesamt 79 Fettzellinkubationen jeweils mit und ohne Insulinzusatz durchgeführt. Die hieraus gewonnenen und an isolierten Fettzellmitochondrien getesteten Extrakte zeigten bereits bei den Kontrollen eine etwa dreifache PDH-Aktivierung und bei den insulinbehandelten Zellen eine um knapp 40 % darüber hinausgehende Wirkung. Diese Effekte waren jedoch nach Vorbehandlung der Extrakte mit Tierkohle völlig aufgehoben, so daß es sich nicht um den Peptidmediator handeln kann, der laut Literatur nicht an Kohle gebunden wird (39). Vielmehr dürfte es sich nach den vorliegenden Untersuchungen im wesentlichen um Nukleotide, vor allem um AMP und ADP handeln, die durch Hemmung der Kinase zur PDH-Aktivierung führen und die nach eigenen Messungen in hinreichenden Konzentrationen in den Zellextrakten vorhanden sind. Eine Erhöhung von ADP und AMP durch Insulin war jedoch nicht gegeben, so daß man von einer second messenger -Rolle dieser Verbindungen nicht sprechen kann.

Die Steigerung der PDH-aktivierenden Wirkung der Extrakte nach Insulinbehandlung ist demnach anderen, an Kohle adsorbierbaren Substanzen, zuzuschreiben. Wegen der geringen Effektivität und dem unverhältnismäßig hohen ex-

perimentellen Aufwand wurde auf eine weitere Klärung dieser Frage verzichtet.

Es ist möglich, wenn auch wenig wahrscheinlich, daß die Nichtauffindung des Peptidmediators in der vorliegenden Arbeit auf methodischen Unterschieden von Labor zu Labor beruht (30). Allerdings scheint der Nachweis dieses Faktors auch anderen Autoren bisher nicht gelungen zu sein (15). Es gibt aber auch eine Reihe theoretischer Überlegungen, die an seiner Existenz zweifeln lassen. So wurde berichtet, daß der Peptidmediator aus Muskel sowohl die Glykogensynthase des Muskels (42), als auch die PDH des Fettgewebes aktiviert (68), d.h. in der Lage sein soll, ein im Zytosol gelagertes Enzym ebenso wie ein mitochondriales Enzym zu regulieren. Weiterhin ist das Vorkommen des selben Mediators in Leberzellen schwer mit der Tatsache in Einklang zu bringen, daß die PDH in der Leber durch Insulin nicht aktivierbar ist (92). Soweit anderslautende Befunde vorliegen, sind sie indirekt durch die antilipolytische Wirkung des Insulins, d.h. eine Senkung des Plasmafettsäurespiegels, zu erklären (92).

Schließlich führt Denton (15) aus stöchiometrischen Überlegungen ein prinzipielles Argument gegen die Freisetzung eines Insulinmediators an, wie er von den betreffenden Autoren postuliert wird: Um eine maximale Insulinantwort zu erhalten, müssen etwa $10^7 - 10^8$ Rezeptoren, berechnet auf 1 μ l Zytoplasma, besetzt sein. Wenn man annimmt, daß für jeden besetzten Insulinrezeptor nur ein messenger- oder Mediatormolekül gebildet und in das Zytoplasma abgegeben wird, so würde die zytoplasmatische Konzentration des Mediators nicht mehr als 0,01 - 1 nMol/l betragen. Andererseits liegen die Kon-

zentrationen der insulinabhängigen Enzyme, z.B. der PDH, wahrscheinlich in der Gegend von $0,1 \mu\text{Mol/l}$ oder darüber. Dies bedeutet, daß Hunderte bis Tausende von Mediator-molekülen pro besetztem Insulinrezeptor gebildet werden müßten, wenn die Stöchiometrie gewährt sein sollte. Da eine Amplifikation des Insulinsignals auf diese Weise schwer vorstellbar ist, muß an andere Mechanismen der Signalvermittlung gedacht werden. Hierauf soll im folgenden noch kurz eingegangen werden.

Nach Denton könnte die Amplifikation nur katalytisch, z.B. durch Einschaltung von Proteinkinasen, erzielt werden. Zahlreiche insulinabhängige intrazelluläre Phosphorylierungen von Proteinen wurden beobachtet (4), (5), (28), (71). Brownsey et al. (8) suchten gezielt nach einer Kinaseaktivität zur Erklärung dieser Phosphorylierungsreaktionen und fanden eine solche auch: Nach Inkubation von Acetyl-CoA-Carboxylase mit gereinigten Fettzellmembranen, ATP und Insulin fanden sie eine deutliche Aktivitätszunahme des Enzyms durch Phosphorylierung. Die Kinase schien auf zyklische Nukleotide und Ca^{2+} nicht zu reagieren. Daraus formulierten sie eine Arbeitshypothese: Die Insulin-Rezeptor-Bindung führt zur Aktivierung einer membrangebundenen Proteinkinase ohne die Notwendigkeit eines intrazellulären second messengers. Die von ihr katalysierten folgenden Phosphorylierungen lösen dann direkt oder indirekt die entsprechenden Insulineffekte aus. Allerdings fällt es mit solch einem Modell schwer, die durch Insulin beobachteten Dephosphorylierungen z.B. an der PDH zu erklären (15).

Die zentrale Rolle von Phosphorylierungsprozessen bei der Wirkung von Insulin ist durch die Entdeckung unterstrichen worden, wonach der Insulinrezeptor selbst die Aktivität einer Proteinkinase besitzt, die sowohl sich selbst, als auch andere Proteine phosphorylieren kann

(36), (37), (47), (53). Die Phosphorylierung von Aktin, einer Komponente des Zytosolskeletts, könnte sich in diesem Zusammenhang von physiologischem Interesse erweisen (48).

Andere Vorstellungen über den Mechanismus der Insulinwirkung betreffen die Rolle von Stoffwechselzwischenprodukten, vor allem H_2O_2 (54), (89), (91). H_2O_2 imitiert zahlreiche Insulinwirkungen wie Stimulierung von Glukose-Transport und -Oxidation, Umwandlung von Glukose in Glykogen, Lipidsynthese im Fettgewebe und Antilipolyse. Darüber hinaus aktiviert H_2O_2 die PDH in Fettzellen, indem es den Anteil der aktiven Form erhöht, ohne die Totalaktivität zu verändern. Die gleiche Wirkung zeigte sich in Leberzellen. Allerdings ist dafür die Unversehrtheit mindestens der inneren Membran der Mitochondrien notwendig. Weiterhin steht fest, daß Insulin die Formiatoxidation in Fettzellen stimuliert (50), (54), eine Methode, die indirekt die Bildung von H_2O_2 anzeigt (89). Die Insulinstimulierung der ^{14}C -Formiat-Oxidation zeigt eine ähnliche lag-Phase wie die Insulinstimulierung der PDH. Es gibt bisher keine konkreten Vorstellungen über den Mechanismus der H_2O_2 -Bildung und seiner Wirkung. Eine Veränderung des ATP/ADP-Quotienten im relevanten Konzentrationsbereich konnte ausgeschlossen werden (91).

Ein weiterer Faktor, der bei der Insulinwirkung eine wichtige Rolle spielen dürfte, ist Calcium. Es liegen Arbeiten vor, die zeigen, daß Insulin den Ca^{2+} -Efflux aus vorbeladenen Zellen sowohl erhöht (10) als auch erniedrigt, besonders in Gegenwart von Adrenalin (26), (40). Trotzdem kommen sowohl Kissebah (40), als auch Hope-Gill (26) zu dem Schluß, daß Insulin zu einer Er-

höhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} führt. Da extrazelluläres Ca^{2+} für die Insulinwirkung nicht benötigt wird, muß diese Erhöhung durch Freisetzung aus intrazellulären Depots erklärt werden. Eine Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} sollte zu einer Erhöhung des intramitochondrialen Ca^{2+} führen (17). Dies könnte eine Aktivierung der PDH erklären, da Ca^{2+} die Phosphatase aktiviert (18). Bisher fehlen jedoch noch Hinweise, daß eine Erhöhung des Ca^{2+} im Zytoplasma einen der zytoplasmatischen Insulineffekte bewirken könnte. Im Gegenteil, eine solche Erhöhung würde z.B. den Glykogenabbau durch Erhöhung der Phosphorylase-Kinase-Aktivität stimulieren, ein der Insulinwirkung entgegengesetzter Stoffwechselvorgang. Möglicherweise bewirkt Insulin aber eine Erhöhung des intramitochondrialen Ca^{2+} -Spiegels durch andere Mechanismen (65).

Insulin ist eines der zentralen Hormone im Stoffwechsel. Medizinisch besitzt es große Bedeutung, biochemisch wurde der Aufklärung seiner Wirkung viel Aufmerksamkeit geschenkt. Trotz allem gelang es bisher nicht, den Mechanismus seiner vielfältigen intrazellulären Wirkungen zu erklären.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Berichte amerikanischer Autoren über das Vorkommen eines peptidartigen Faktors, der unter der Wirkung des Insulins aus der Plasmamembran freigesetzt werden und als "second messenger" der Insulinwirkung dienen soll, haben in den letzten Jahren großes Aufsehen erregt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Existenz dieses Peptidmediators zu bestätigen und ihn gegebenenfalls näher zu charakterisieren.

Die Versuchsanordnung richtete sich im wesentlichen nach der einschlägigen Literatur, wobei isolierte Rattefettzellen nach Inkubation mit Insulin extrahiert und die Extrakte auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurden, eine Aktivierung des PDH-Komplexes in intakten Fettzellmitochondrien auszulösen. Um die Insulinansprechbarkeit der Fettzellen zu prüfen, wurde die PDH-Aktivität jeweils direkt im Anschluß an die Inkubation bestimmt.

Im Mittel bewirkte Insulin, in guter Übereinstimmung mit der Literatur, eine 2,5-fache Aktivierung des Enzyms. Hitzedenaturierte Extrakte insulinbehandelter Fettzellen steigerten die PDH-Aktivität isolierter Fettzellmitochondrien in 79 Experimenten hochsignifikant um knapp 40 % gegenüber insulinfreien Kontrollen, die jedoch selbst schon eine etwa 3-fache Aktivierung bewirkten. Diese Effekte wurden durch Vorbehandlung der Extrakte mit Aktivkohle vollständig aufgehoben. Dies steht im Gegensatz zudem Verhalten des Peptidmediators, der nicht an Kohle gebunden werden soll. In den Extrakten wurden AMP und ADP in Konzentrationen gemessen, die an isolierten Mitochondrien entsprechende Aktivierungen der PDH verursachen, jedoch ergaben sich keine auffallenden Veränderungen durch Insulin.

Weitere Reinigungsversuche der Zellextrakte durch Sephadex-Chromatographie führten zu aktiven Fraktionen mit Absorptionssgipfeln bei 260 nm, die nach enzymatischer Analyse AMP und ADP enthielten. Dabei ergaben sich keine auffallenden Unterschiede zwischen insulinbehandelten- und Kontrollzellen, jedoch reichten die Nukleotidkonzentrationen aus, um die durch die Kontrollextrakte bewirkte PDH-Aktivierung zu erklären. Der zusätzliche Effekt der Extrakte nach Insulinstimulierung dürfte auf eine ebenfalls an Kohle adsorbierbare Substanz zurückgehen, die jedoch nicht näher charakterisiert werden konnte.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen läßt sich folgendes feststellen:

1. Ein Insulin-induzierter, PDH-aktivierender Faktor, der den Eigenschaften des in der Literatur beschriebenen "Peptid-Mediators" entspricht, konnte in Ratenfettzellen nicht nachgewiesen werden.
2. Zusatz eiweißfreier Fettzellextrakte zu isolierten Fettzellmitochondrien führt zu einer etwa 3-fachen PDH-Aktivierung, die wahrscheinlich auf der Anwesenheit von AMP und ADP beruht. Entsprechende Extrakte insulinbehandelter Zellen bewirken eine darüber hinausgehende Aktivierung um 40 %, die offenbar einem nukleotidähnlichen, an Kohle adsorbierbaren Faktor mit second messenger Aktivität zuzuschreiben ist. Eine weitere Charakterisierung dieser Verbindung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.
3. Nach den vorliegenden Ergebnissen und negativen Befunden anderer Laboratorien, sowie aus theoretischen

Überlegungen kann die vorgeschlagene Bedeutung eines Peptidmediators als second messenger der Insulinwirkung keine Unterstützung finden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Addink A.D.F., Boer P., Wakabayashi T., Green D.E.: Enzyme Localization in Beef-Heart Mitochondria, Eur. J. Biochem., 29 47-59 (1972)
- (2) Barrera C.R., Namihira G., Hamilton L., Munk P., Eley M.H., Linn T.C., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes XVI. Studies on the Subunit Structure of the PDH Complexes from Bovine Kidney and Heart, Arch. Biochem. Biophys., 148 343-358 (1972)
- (3) Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher T., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kärntnermuskulatur in einem Arbeitsgang, Z. Naturforsch. 8b 555-577 (1953)
- (4) Belsham G.J., Brownsey R.W., Hughes W.A., Denton R.M.: Anti-Insulin Receptor Antibodies Mimic the Effects of Insulin on the Activities of PDH and Acetyl-CoA Carboxylase and on Specific Protein Phosphorylation in Rat Epididymal Fat Cells, Diabetologia, 18 307-312 (1980)
- (5) Belsham G.J., Denton R.M.: The Effect of Insulin and Adrenaline on the Phosphorylation of a 22,000-molecular weight protein within Isolated Fat Cells; possible Identification as the Inhibitor-I of the "General Phosphatase", Biochem.Soc.Trans. 8 382-383 (1980)
- (6) Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica: Test-Fibel. Hämoglobin, (1979)
- (7) Bremer J.: PDH, Substrate Specificity and Product Inhibition, Eur.J.Biochem., 8 535-540 (1969)
- (8) Brownsey R.W., Belsham G.J., Denton R.M.: Evidence for Phosphorylation and Activation of Acetyl-CoA Carboxylase by a Membrane-Associated cAMP-independent Protein Kinase, FEBS Letters, 124 145-150 (1981)

- (9) Cheng K., Galasko G., Huang L., Kellogg J., Larner J.: Studies on the Insulin Mediator II. Separation of two Antagonistic Biologically Active Materials from Fraktion II, Diabetes 29 659-661 (1980)
- (10) Clausen T., Martin B.R.: The Effect of Insulin on the Washout of (⁴⁵Ca)Calcium from Adipocytes and Soleus Muscle of the Rat, Biochem. J., 164 251-255 (1977)
- (11) Cooper R.H., Denton R.M., Pask H.T., Randle P.J., Severson D.L., Whitehouse S.: Regulation of Mammalian PDH In: Fischer E.H., Krebs E.G., Neurath H., Stadtman E.R. (Eds.): 3rd Int.Symp. on Metabolic Interconversion of Enzymes, Springer Berlin, Heidelberg, New York 109-116 (1973)
- (12) Coore H.G., Denton R.M., Martin B.R., Randle P.J.: Regulation of Adipose Tissue PDH by Insulin and other Hormones, Biochem.J. 125 115-127 (1971)
- (13) Czech M.P.: Molecular Basis of Insulin Action, Ann.Rev.Biochem. 46 359-384 (1977)
- (14) Demers L.M., Gabbe S.G., Villée C.A., Green R.O.: The Effects of Insulin on Human Placental Glycogenesis, Endocrinology, 91 270-275 (1972)
- (15) Denton R.M., Brownsey R.W., Belsham G.J.: A Partial View of the Mechanism of Insulin Action, Diabetologia, 21 347-362 (1981)
- (16) Denton R.M., Coore H.G., Martin B.R., Randle P.J.: Insulin activates PDH in Rat Epididymal Adipose Tissue, Nature New Biology, 231 115-116 (1971)
- (17) Denton R.M., McCormack J.G.: On the Role of the Calcium Transport Cycle in Heart and other Mammalian Mitochondria, FEBS Letters, 119 1-8 (1980)
- (18) Denton R.M., Randle P.J., Bridges B.J., Cooper R.H., Kerbey A.L., Pask H.T., Severson D.L., Stansbie D., Whitehouse S.: Regulation of Mammalian PDH, Mol.Cell.Biochem., 9 27-53 (1975)
- (19) Free M.J., Payvar F.: PDH-Activity in the Normal and Cryptorchid Rat Testis, Biology of Reproduction, 10 69-73 (1974)

- (20) Freinkel N.: Effects of the Conceptus on maternal Metabolism during Pregnancy In: Leibel B.S., Wrenshall G.A. (Eds.): The Nature and Treatment of Diabetes Mellitus, Excerpta Medica Found., Amsterdam 1965 679-691
- (21) Garland P.B., Randle P.J.: Control of PDH in the Perfused Rat Heart by the Intracellular Concentration of Acetyl-Coenzyme A, *Biochem. J.*, 91 6c-7c (1964)
- (22) Gerbitz K.P.: Pankreatische B-Zell-Peptide. Kinetik und Konzentration von Proinsulin, Insulin und C-Peptid in Plasma und Urin. *J. Clin.Chem.Biochem.*, 18 313-326 (1980)
- (23) Guder W., Siess E.A., Wieland O.H.: Studies on Glucose Synthesis in Rat Kidney Cell Suspensions, *FEBS Letters*, 3 31-33 (1969)
- (24) Harper H.A., Löffler G., Petrides P.E., Weiss L.: (Hrsg.) *Physiologische Chemie* Springer Berlin, Heidelberg, New York 282 (1975)
- (25) Hennig G., Löffler G., Wieland O.H.: Active and Inactive Forms of PDH in skeletal Muscle as related to the Metabolic and Functional State of the Muscle Cell, *FEBS Letters* 59 142-145 (1975)
- (26) Hope-Gill H., Kissebah A., Tulloch B., Clarke P., Vydelingum N., Fraser T.R.: The Effects of Insulin on Adipocyte Calcium Flux and the Interaction with the Effects of Dibutyryl Cyclic AMP and Adrenaline, *Horm.Metab.Res.*, 7 194-196 (1975)
- (27) Hucho F., Randall D.D., Roche T.E., Burgett M.W., Pelley J.W., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes XVII. Kinetic and Regulatory Properties of PDH Kinase and PDH Phosphatase from Bovine Kidney and Heart, *Arch. Biochem. Biophys.*, 151 328-340 (1972)
- (28) Hughes W.A., Brownsey R.W., Denton R.W.: Studies on the Incorporation of (32 P)phosphate into PDH in intact Rat Fat-cells, *Biochem.J.*, 192 469-481 (1980)
- (29) Ishikawa E., Oliver R.M., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes V. Macromolecular Organization of Pyruvate and α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complexes isolated from Beef Kidney Mitochondria, *Proc.Natl.Ac.Sc.USA*, 56 534-541 (1966)

- (30) Jarett L.: Subcellular Fractionation of Adipocytes, *Methods Enzymol.*, 31 60-71 (1974)
- (31) Jarett L., Kiechle F.L., Popp D.A., Katagal N., Gavin III J.R.: Differences in the Effect of Insulin on the Generation by Adipocytes and IM-9 Lymphocytes of a Chemical Mediator which Stimulates the Action of Insulin on PDH, *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 96 735-741 (1980)
- (32) Jarett L., Seals J.R.: PDH Activation in Adipocyte Mitochondria by an Insulin-Generated Mediator from Muscle, *Science*, 206 1407-1408 (1979)
- (33) Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H.U.: Messung von ADP und AMP In: *Methoden der Enzym. Anal.* (Hrsg.: H.U.Bergmeyer) Verlag Chemie, Weinheim 3. Aufl. 1974 2178-2181
- (34) Jungas R.L.: Effect of Insulin on Fatty Acid Synthesis from Pyruvate, Lactate, or Endogenous Sources in Adipose Tissue: Evidence for the Hormonal Regulation of Pyruvate Dehydrogenase, *Endocrinology* 86 1368-1375 (1970)
- (35) Jungas R.L.: Hormonal Regulation of PDH, *Metabolism*, 20 43-53 (1971)
- (36) Kasuga M., Karlsson F.A., Kahn C.R.: Insulin Stimulates the Phosphorylation of the 95,000-Dalton Subunit of its own Receptor, *Science* 215 185-187 (1982)
- (37) Kasuga M., Zick Y., Blithe D.L., Crettaz M., Kahn C.R.: Insulin Stimulates Tyrosine Phosphorylation of the Insulin Receptor in a Cell-free System, *Nature* 298 667-669 (1982)
- (38) Kiechle F.L., Jarett L., Kotagal N., Popp D.A.: Partial Purification from Rat Adipocyte Plasma Membranes of a Chemical Mediator which Stimulates the Action of Insulin on PDH, *J.Biol.Chem.*, 256 2945-2951 (1981)
- (39) Kiechle F.L., Jarett L., Popp D.A., Kotagal N.: Isolation from Rat Adipocytes of a Chemical Mediator for Insulin Activation of PDH, *Diabetes*, 29 852-855 (1980)

- (40) Kissebah A.H., Clarke P., Vydelingum N., Hope-Gill H., Tulloch B., Fraser T.R.: The Role of Calcium in Insulin Action, *Europ.J.Clin.Invest.*, 5 339-349 (1975)
- (41) Kolb H.J., Standl E.: Purification to Homogeneity of an Insulin-Degrading Enzyme from Human Erythrocytes, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 361 1029-1039 (1980)
- (42) Larner J., Galasko G., Cheng K., De Paoli-Roach A.A., Huang L., Daggy P., Kellogg J.: Generation by Insulin of a Chemical Mediator that Controls Protein Phosphorylation and Dephosphorylation, *Science*, 206 1408-1410 (1979)
- (43) Linn T.C., Pelley J.W., Pettit F.H., Hucho F., Randall D.D., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes XV. Purification and Properties of the Component Enzymes of the PDH-Complexes from Bovine Kidney and Heart *Arch.Biochem. Biophys.*, 148 327-342 (1972)
- (44) Linn T.C., Pettit F.H., Hucho F., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes XI. Comparative Studies of Regulatory Properties of the PDH Complexes from Kidney, Heart and Liver Mitochondria, *Proc.Natl.Ac.Sc.USA* 64 227-234 (1969)
- (45) Linn T.C., Pettit F.H., Reed L.J.: α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes X. Regulation of the Activity of the PDH-Complex from Beef Kidney Mitochondria by Phosphorylation and Dephosphorylation *Proc.Natl. Ac.Sc.USA*, 62 234-241 (1969)
- (46) Löffler G., Bard S., Wieland O.H.: Control of PDH Interconversion by Palmitoyl-Coenzyme A as related to Adenine Nucleotide Translocation in isolated Fat Cell Mitochondria *FEBS Letters* 60 269-274 (1975)
- (47) Machicao F., Urumow T., Wieland O.H.: Phosphorylation-Dephosphorylation of purified Insulin receptor from Human Placenta, *FEBS Letters*, 149 96-100 (1982)
- (48) Machicao F., Urumow T., Wieland O.H.: Evidence for Phosphorylation of actin by the insulin Receptor-associated Protein Kinase from Human Placenta *FEBS Letters* 163 76-80 (1983)

- (49) May J.M., de Haën C.: The Insulin-like Effect of Hydrogen Peroxide on Pathways of Lipid Synthesis in Rat Adipocytes, *J.Biol.Chem.*, 254 9017-9021 (1979)
- (50) Mukherjee S.P., Lane R.H., Lynn W.S.: Endogenous Hydrogen Peroxide and Peroxidative Metabolism in Adipocytes in Response to Insulin and Sulfhydryl Reagents, *Biochem.Pharma.*, 27 2589-2594 (1978)
- (51) Mukherjee S.P., Mukherjee C., Lynn W.S.: Activation of Pyruvate Dehydrogenase in Rat Adipocytes by Concavalin A: Evidence for Insulin-like Effect mediated by Hydrogen Peroxide, *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 93 36-41 (1980)
- (52) Nestorescu M.L., Siess E.A., Wieland O.H.: Ultra-structural Localization of PDH in Rat Heart Muscle, *Histochemie*, 34 355-360 (1973)
- (53) Obberghen E.v., Kowalski A.: Phosphorylation of the Hepatic Insulin Receptor, *FEBS Letters* 143 179-182 (1982)
- (54) Paetzke-Brunner I., Wieland O.H.: Activation of the PDH Complex in isolated Fat Cell Mitochondria by Hydrogen Peroxide and t-Butyl-Hydroperoxide, *FEBS Letters*, 122 29-32 (1980)
- (55) Parker J.C., Kiechle F.L., Jarett L.: Partial Purification from Hepatoma Cells of an intracellular Substance which mediates the Effects of Insulin on PDH and low k_m -cAMP Phosphodiesterase, *Arch.Biochem.Biophys.*, 215 339-344 (1982)
- (56) Pettit F.H., Pelley J.W., Reed L.J.: Regulation of PDH Kinase and Phosphatase by Acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD Ratios, *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 65 575-582 (1975)
- (57) Pettit F.H., Roche T.E., Reed L.J.: Function of Calcium Ions in PDH Phosphatase Activity, *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 49 563-571 (1972)
- (58) Popp D.A., Kiechle F.L., Kotagal N., Jarett L.: Insulin Stimulation of PDH in an Isolated Plasma Membrane-Mitochondrial Mixture Occurs by Activation of PDH Phosphatase, *J.Biol.Chem.*, 255 7540-7543 (1980)

- (59) Reed L.J., Linn T.C., Hucho F., Namihira G., Barrera C.R., Roche T.E., Pelley J.W., Randall D.D.: Molecular Aspects of the Regulation of the Mammalian PDH-Complex In: Wieland O.H., Helmreich E., Holzer H. (Eds.): 2nd Int. Symp. on Metabolic Interconversion of Enzymes, Springer Berlin Heidelberg New York 281-291 (1972)
- (60) Reed L.J., Linn T.C., Pettit F.H., Oliver R.M., Hucho F., Pelley J.W., Randall D.D., Roche T.E.: PDH Complex: Structure, Function and Regulation In: Mehlman, Hanson: Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria, Academic Press New York London 253-270 (1972)
- (61) Reed L.J., Pettit F.H.: Phosphorylation and De-phosphorylation of Pyruvate Dehydrogenase. Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif. 8 701-711 (1981)
- (62) Rodbell M.: Metabolism of Isolated Fat Cells, J.Biol.Chem. 239 375-380 (1964)
- (63) Saltiel A., Jacobs S., Siegel M., Cuatrecasa P.: Insulin stimulates the Release from Liver Plasma Membranes of a Chemical Modulator of PDH, Biochem. Biophys. Res. Comm., 102 1041-1047 (1981)
- (64) Saltiel A.R., Siegel M.I., Jacobs S., Cuatrecasas P.: Putative mediators of Insulin Action: Regulation of PDH and Adenylate Cyclase Activities, Proc.Natl.Ac.Sc.USA 79 3513-3517 (1982)
- (65) Sanger F.: Chemistry of Insulin, Science, 129 1340-1344 (1959)
- (66) Saucier J., Dubé J.Y., Tremblay R.R.: Specific Insulin Binding Sites in Rat Testis: Characterization and Variation, Endocrinology, 109 2220-2225 (1981)
- (67) Schnaitman C., Greenawalt J.W.: Enzymatic Properties of the Inner and Outer Membranes of Rat Liver Mitochondria, J. Cell. Biol. 38 158-175 (1968)
- (68) Seals R.J., Czech M.P.: Evidence that Insulin activates an Intrinsic Plasma Membrane Protease in Generating a Secondary Chemical Mediator, J.Biol.Chem., 255 6529-6531 (1980)

- (69) Seals R.J., Czech M.P.: Characterization of a PDH Activator Released by Adipocyte Plasma Membranes in Response to Insulin J.Biol.Chem., 256 2894-2899 (1981)
- (70) Seals J.R., Jarett L.: Activation of PDH by direct addition of insulin to an isolated plasma membrane/mitochondria mixture: Evidence for generation of insulin's messenger in a subcellular system, Proc.Natl.Acad., 77 77-81 (1980)
- (71) Seals J.R., McDonald J.M., Jarett L.: Insulin Effect on Protein Phosphorylation of Plasma Membranes and Mitochondria in a Subcellular System from Rat Adipocytes, J.Biol.Chem., 254 6991-6996 (1979)
- (72) Sedlmayer G.: Die Bedeutung des Blutgehaltes in Organen bei biochemischen Analysen, Dissertation Uni Hamburg (1955)
- (73) Sica V., Cuatrecasas P.: Effects of Insulin, Epinephrine and Cyclic Adenosine Monophosphate on PDH of Adipose Tissue, Biochemistry, 12 2282-2291 (1973)
- (74) Siess E., Teinzer A., Wieland O.H.: Eine vereinfachte Fettgewebismethode zur Insulinbestimmung im Serum, Diabetologia, 1 201-207 (1965)
- (75) Siess E.A., Wieland O.H.: Purification and Characterization of PDH Phosphatase from Pig Heart Muscle Eur.J.Biochem., 26 96-105 (1972)
- (76) Söling H.D., Bernhard G.: Interconversion of Inactive to Active PDH in Rat Liver after Fructose Application in vivo, FEBS Letters, 13 201-203 (1971)
- (77) Sutherland E.W.: Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hormone, Angew. Chemie, 84 1117-1125 (1972)
- (78) Sutherland E.W., Rall T.W.: Fractionation and Characterization of a cyclic Adenine Ribonukleotide formed by Tissue Particles, J.Biol.Chem., 232 1077-1091 (1958)
- (79) Szabo A.J., Grimaldi R.D.: The Effect of Insulin on Glucose Metabolism of the Incubated Human Placenta, Amer.J.Obstet.Gynec., 106 75-78 (1970)
- (80) Tabor H., Mehler A.H., Stadtman E.R.: The Enzymatic Acetylation of Amines, J.Biol.Chem. 204 127-138 (1953)

- (81) Taylor S.I., Jungas R.L.: Regulation of Lipogenesis in Adipose Tissue: The Significance of the Activation of PDH by Insulin, Arch.Biochem.Biophys., 164 12-19 (1974)
- (82) Taylor S.I., Mukherjee C., Jungas R.L.: Studies on the Mechanism of Activation of Adipose Tissue PDH by Insulin, J.Biol.Chem. 248 73-81 (1973)
- (83) Tscheche H., Dietl T., Kolb H.J., Standl E.: An Insulin Degrading Proteinase from Human Erythrocytes and its Inhibition by Proteinase Inhibitors, In: Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors" Springer 1974 586-593
- (84) Villée C.A.: The Metabolism of Human Placenta in vitro, J.Biol.Chem. 205 113-123 (1953)
- (85) Weiss L., Löffler G., Schirmann A., Wieland O.H.: Control of PDH Interconversion in Adipose Tissue by Insulin, FEBS Letters, 15 229-231 (1971)
- (86) Weiss L., Löffler G., Wieland O.H.: Regulation by Insulin of Adipose Tissue PDH, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 335 363-377 (1974)
- (87) White R.H., Bleile D.M., Reed L.J.: Lipoic Acid Content of Dihydrolipoyl Transacetylases determined by Isotope Dilution Analysis, Biochem.Biophys. Res.Com., 94 78-84 (1980)
- (88) Wieland O.H.: Molekulare Endokrinologie, Verhandlungen der Dt. Gesellschaft für Innere Medizin, 78 331-344 (1972)
- (89) Wieland O.H.: The Mammalian PDH-Complex: Structure and Regulation, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 96 124-170 (1983)
- (90) Wieland O.H., v. Jagow-Westermann B., Stukowski B.: Kinetic and Regulatory Properties of Heart Muscle PDH, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 350 329-334 (1969)
- (91) Wieland O.H., Paetzke-Brunner I.: Regulation of Adipose Tissue PDH by Insulin: Possible Messenger Role of Peroxide(s) In: Holzer H. (ed.): Metabolic Interconversion of Enzymes 1980 Springer 1981 134-142

- (92) Wieland O.H., Patzelt C., Löffler G.: Active and Inactive Forms of Pyruvate Dehydrogenase in Rat Liver, *Eur.J.Biochem.* 26 426-433 (1972)
- (93) Wieland O.H., Siess E.A.: Interconversion of Phospho- and Dephospho-Forms of Pig Heart PDH, *Proc.Natl.Ac.Sc.USA* 65 947-954 (1970)
- (94) Wieland O.H., Siess E., Funcke H.J.v., Patzelt O., Schirmann A., Löffler G., Weiss L.: Regulation of the Mammalian PDH-Complex: Physiological Aspects and Characterization of PDH-Phosphatase from Pig Heart In: 2nd Int.Symp.on Met. Interconversion of Enzymes (Hrsg.: Wieland O.H., Helmreich E., Holzer H.) Springer Berlin Heidelberg New York 293-309 (1972)
- (95) Wieland O.H., Siess E.A., Schulze-Wethmar F.H., v. Funcke H.G., Winton B.: Active and Inactive Forms of PDH in Rat Heart and Kidney: Effect of Diabetes, Fasting and Refeeding on PDH Interconversion, *Arch. Biochem. Biophys.*, 143 593-601 (1971)
- (96) Wieland O.H., Siess E.A., Weiss L., Löffler G., Patzelt C., Portenhauser R., Hartmann U., Schirmann A.: Regulation of the Mammalian PDH Complex by Covalent Modification In: Symposia of the Society for Experimental Biology No. XXVII Rate Control of Biological Processes Cambridge University Press 371-400 (1973)
- (97) Wieland O.H., Weiss L., Löffler G., Brunner I., Bard S.: On the mechanism of insulin action on PDH interconversion in adipose tissue In: Fischer E.H., Krebs E.G., Neurath H. (Eds.) *Metabolic Interconversion of Enzymes*, Springer, Heidelberg Berlin New York 117-129 (1974)
- (98) Winegard A.I., Renold A.E.: Studies on Rat Adipose Tissue in vitro I. Effects of Insulin on the metabolism of Glucose, Pyruvate and Acetate, *J. Biol.Chem.*, 233 267-272 (1958)
- (99) Winegard A.I., Renold A.E.: Studies on Rat Adipose Tissue in vitro II. Effects of Insulin on the Metabolism of specifically labeled Glucose, *J.Biol. Chem.*, 233 273-276 (1958)

DANKSAGUNG

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. O. Wieland, durch dessen Betreuung ich den Inhalt des Wortes "Doktorvater" wirklich verstand!

Frau Dr. B. Köpfer-Hobelsberger war mir eine geduldige Lehrerin am Laborplatz. Ihr möchte ich herzlich danken!

Schließlich möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschergruppe Diabetes für die Aufnahme in ihre Gruppe und die mir gewährte Hilfe danken!

LEBENS LAUF

Am 8. Mai 1958 in Rosenfeld/Zollernalbkreis (Baden-Württemberg) geboren.

Eltern: Margarete Michalski, geb. Leicht,
geboren am 22.05.1933, kauf-
männische Angestellte

Johannes Michalski, geboren am
16.04.1920, Kaufmann

Geschwister: Ursula, geboren am 05.06.1959,
Medizinstudentin

Volker, geboren am 17.09.1966,
Schüler

Schule und Studium:

April 1965 - August 1968 Grundschule Rosenfeld

Sept. 1968 - Juli 1974 Progymnasium Rosenfeld

August 1974 - Mai 1977 Gymnasium Balingen

Mai 1977	Abitur
----------	--------

Okt. 1977 - Juli 1980 Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Sept. 1980 - Juli 1981 Queen's University Belfast/
Nordirland

Okt. 1981 - Sept. 1984 Ludwig-Maximilians-Universität
München

Seit März 1978 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes.

